

Aus der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere,
Tübingen a. N., Präsident: Professor Dr. M. Mussgay
Abteilung für Impfstoffprüfung und Typendiagnose:
Leitender Direktor und Professor Dr. G. Eißner

Vorgelegt über das Institut für Virologie
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Direktor: Professor Dr. R. Rott

**Die Empfindlichkeit verschiedener Zellsysteme
zum Nachweis von „restaktivem“ Virus
in Formalin-inaktivierter Maul- und Klauenseuche
Vakzine**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
bei der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

Eingereicht von

Aly Youssif Ahmed Moussa
Tierarzt aus Shebin El-Kom/Ägypten

Gießen 1969

Mit Genehmigung der Veterinär-Medizinischen Fakultät
in Gießen

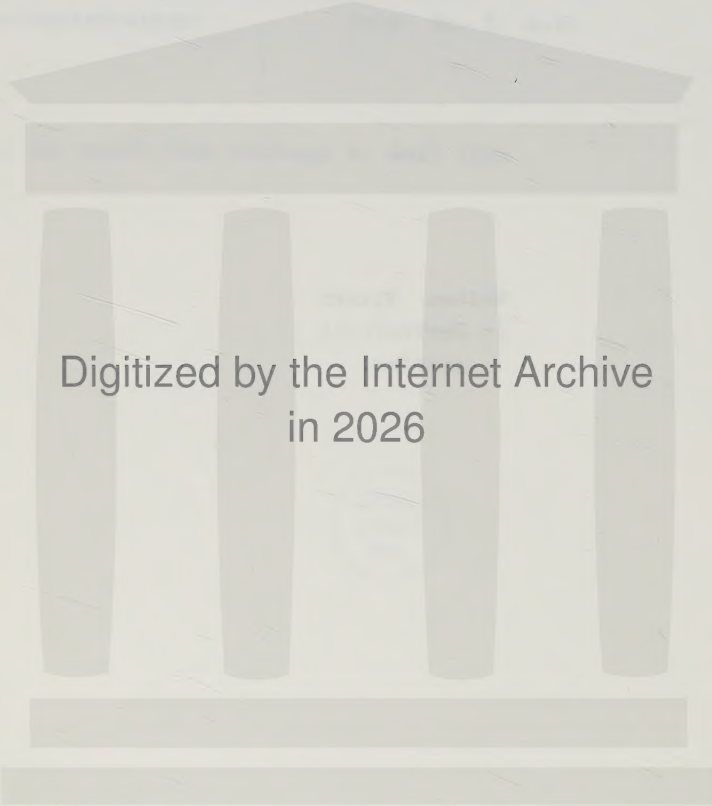
Dekan: Prof. Dr. H. Tillmann

Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rott

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Juli 1969



Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Inhaltsverzeichnis

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	1
B. Literatur	
1. Das MKS-Virus	4
2. Viruszüchtung	7
3. Empfindlichkeit verschiedener Testsysteme	7
4. Geschichte der MKS-Vakzine	10
C. Material und Methoden	
1. Virusstämme	13
2. Lösungen	13
3. Zellkulturen	14
4. Virus-Passagen	16
5. Virustitrationen	17
6. Nachweis von bestimmten Virusmengen	18
7. Dosis-Wirkungs-Kurve	18
8. Formalin-Inaktivierungsversuche	19
9. Formalin-Inaktivierungsversuche von MKS- Adsorbatimpfstoffen	20
10. Vakzine-Prüfung	21
D. Ergebnisse	
1. Virus-Passagen	22
2. Titration von ENS-adaptiertem MKS-Virus in ENS- und ESK-Kulturen	22
3. Nachweis von bestimmten Virusmengen	25
4. Mittlerer Virustiter (DWK)	27
5. Formalin-Inaktivierungsversuche	28
6. Formalin-Inaktivierungsversuche von MKS- Adsorbatimpfstoffen	33
7. Vakzine-Prüfung	35
E. Besprechung der Ergebnisse	36
F. Zusammenfassung	45
G. Literaturverzeichnis	46
Lebenslauf	

A. Einleitung

Bei der Bekämpfung von Tierseuchen, die hohe Verluste verursachen und damit große volkswirtschaftliche Bedeutung haben, ist die Prophylaxe mittels Schutzimpfung ausschlaggebend. Von den im Rahmen der vorbeugenden Maßnahmen zum Einsatz kommenden Impfstoffen sind Unschädlichkeit und Wirksamkeit zu fordern. Beide Begriffe sind der Schwerpunkt jeder Prüfungsvorschrift für Sera und Impfstoffe. Entsprechend dem Thema der Arbeit wird im folgenden nur der Begriff "Unschädlichkeit" besprochen. Unschädlichkeit bedeutet: der Impfstoff muß frei sein vom aktiven Erreger, der zur Produktion des Impfstoffes dient, er darf keine anderen bakteriellen oder viralen Erreger enthalten und keine das normale Maß übersteigenden Reaktionen am Ort der Injektion auslösen. Die Prüfung auf Unschädlichkeit erfolgt mit verschiedenen bakteriologischen, virologischen, mykologischen diagnostischen Verfahren sowie im Tierversuch, entweder an kleinen Laboratoriumstieren oder am Impfling selbst. Von größter Bedeutung ist bei diesen Prüfungen der Nachweis über das Freisein vom Produktionsvirus, bezogen auf die gestellte Aufgabe heißt das: Freisein vom Virus der Maul- und Klauenseuche (MKS).

Als unschädlich in diesem Sinne kann eine Vakzine bezeichnet werden, wenn das zur Impfstoffherstellung verwendete MKS-Virus bis zu einem solchen Grad abgeschwächt, inaktiviert bzw. abgetötet ist, daß eine Verabreichung des Impfstoffs an für das Virus voll empfängliche Rinder keine MKS-Erkrankung hervorruft.

Zum Nachweis von aktivem Virus in inaktivierten MKS-Impfstoffen wird im Rahmen der staatlichen Prüfungsrichtlinien (Unschädlichkeitsprüfung) das MKS-empfängliche Rind als Versuchstier verwendet. Die dadurch bedingten hohen Kosten zwingen zur Beschränkung auf nur wenige Tiere und damit wird nur ein sehr geringes Stichprobenvolumen jeder Impfstoffcharge, die zum Teil aus mehr als 2000 Liter besteht, geprüft, nämlich für einen trivalenten Impfstoff je 5.0 ml auf drei Rindern intradermolingual, insgesamt sind das nur 15.0 ml von mehr als 2000 Litern Impfstoff! Selbstverständlich läßt die später für die Wirksamkeitsprüfung folgende subkutane Injektion von je 5.0 ml an insgesamt 12 Tieren auch

noch Aussagen über die Unschädlichkeit im Sinne des Freiseins vom spezifischen Impfstoffvirus zu.

Diese begrenzte Stichprobe erlaubt keine absolut sichere Aussage über das Freisein der Vakzine von aktivem Restvirus. Es besteht die Möglichkeit, daß die Stichprobe rein zufällig kein infektiöses Teilchen enthält. Je größer das geprüfte Stichprobenvolumen desto sicherer ist die Aussage über die Unschädlichkeit und desto sicherer auch ihr Einsatz in der Praxis.

Der Tierversuch mit einem so begrenzten Stichprobenvolumen gibt keine verlässliche Auskunft, ob die inaktivierte Virussuspension noch vermehrungsfähige infektiöse Teilchen enthält. Dafür ist auch die Empfindlichkeit der verschiedenen Versuchstiere innerhalb einer Spezies verantwortlich. Andererseits kann eine schnelle Immunitätsbildung die Vermehrung von infektiösen Restaktivitäten in Vakzinen erschweren.

Die Kinetik der Virusinaktivierung durch Formaldehyd, wie sie in der Regel für die Vakzineproduktion benutzt wird, zwingt zu der Annahme, daß gewisse infektiöse Restpartikeln vorhanden sind, auch noch nach Ablauf längerer Einwirkungszeiten.

Die Kombination der Adsorption des Virus an Aluminiumhydroxyd und seine dann folgende Inaktivierung durch Formaldehyd und Wärme führen zu einem Impfstoff, der bei Rindern keine MKS hervorruft. Es wird aber von typischen MKS-Veränderungen in abortiver Form nach Verimpfung solcher Vakzinen berichtet.

Auch ist es in einzelnen Fällen gelungen, aktives Virus aus MKS-Adsorbat-Vakzinen zu isolieren, obwohl sich in allen Fällen die Vakzine im Rahmen der in den Staatlichen Prüfungsvorschriften festgelegten Nachweismethoden als nicht infektiös erwiesen hatte. Daher wird die Ansicht vertreten, daß die MKS-Formoladsorbatvakzine kein "Totimpfstoff", sondern eine in ihrer Virulenz (Infektiosität) blockierte Vakzine ist.

Die Unzulänglichkeiten des Tierversuches zur Feststellung des Freiseins von MKS-Virus und vor allem das geringe Stichprobenvolumen lassen es zweckmäßig erscheinen, die Frage zu prüfen,

ob die Zellkultur, bei der Unschädlichkeitsprüfung erfolgreich eingesetzt werden kann, wobei zunächst ermittelt werden muß, welche Zellarten empfindlicher auf Spuren von aktivem Rest-Virus reagieren und daher als geeignetes System für den Nachweis der Unschädlichkeit angesehen werden können. Gleichzeitig scheint es notwendig, den durch Formalin ausgelösten Inaktivierungsprozeß näher zu verfolgen.

B. Literatur

1. Das MKS-Virus

Auf Grund seiner physikalisch-chemischen Eigenschaften gehört das MKS-Virus zu den kleinen RNS-haltigen und Äther-resistenten Viren der Picorna-Gruppe (International Enterovirus-study Group, 1963).

Loeffler und Frosch (1897) untersuchten als erste die Filtrierbarkeit des MKS-Virus. Empfänglich für das MKS-Virus sind Klauentiere wie Rinder, Ziegen, Schafe, Schweine, Rentiere, Büffel, Lamas und Kamele. Auch Elefanten können erkranken. Die Maul- und Klauenseuche ist hoch kontagiös; sie verläuft mit Fieber und ist charakterisiert durch die Entwicklung von Blasen und Erosionen an den mit Plattenepithel ausgestatteten Teilen der Schleimhäute des Verdauungskanals und an den unbehaarten Stellen der Haut.

Bevorzugte Versuchstiere für experimentelle Infektionen sind Meerschweinchen, Säuglingsmäuse sowie erwachsene Mäuse und auch Welpen. Erkrankungen des Menschen sind bekannt (EiBner u.a., 1967). Vom Wild sind nur die in Gefangenschaft gehaltenen Klauentiere (Zoologische Gärten) stark bedroht. In freier Wildbahn lebendes Wild ist gegenüber der MKS widerstandsfähiger.

Das MKS-Virus ist ein kugelförmiges Teilchen mit einem Durchmesser von 23 ± 2 nm und einem Molekulargewicht von $6.9 \pm 0.6 \cdot 10^6$. Seine Flotationsdichte wird mit 1.43 ± 0.01 gm/ml angegeben. Die Sedimentationskonstante liegt bei 141 ± 7 S (Svedbergeinheiten).

Das MKS-Virus besteht aus einem RNS-Strang und einer Proteinhülle. Beide Komponenten werden in der Zelle getrennt synthetisiert und erst später zum fertigen Virion zusammengebaut. Das Mengenverhältnis beträgt 32% RNS und 68% Protein (Literatur bei Bachrach, 1967).

Die RNS des Virus ist der infektiöse Anteil; sie wird im Zytoplasma der Zelle synthetisiert (Arlinghaus u.a., 1968) und ist auch im isolierten Zustand infektiös (Mussgay u.a., 1958). Die isolierte RNS ist ein Einzelstrang mit einem Molekulargewicht von $2.2 \cdot 10^6$, einer Sedimentationskonstanten von 37 S, einer Dichte

von 1.8 gm/ml. Das Basenverhältnis der RNS beträgt Guanin 0.24, Adenin 0.26, Cytosin 0.28 und Uracil 0.22.

Die Proteinhülle (Capsid) besteht aus 32 Capsomeren, die in Rotationssymmetrie angeordnet sind. Das Capsid hat ein Molekulargewicht von $4.7 \cdot 10^6$ (Literatur bei Bachrach, 1967) und ist vermutlich aus einheitlichen Polypeptidketten aufgebaut (Strohmaier u.a., 1967; van de Woude u.a., 1968); es enthält 12 bzw. 18 verschiedene Aminosäuren (Bachrach u.a., 1967; Strohmaier u.a., 1967). Jede Capsomere ist vermutlich aus fünf Polypeptidketten aufgebaut (van de Woude, 1968). Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung treten sowohl innerhalb der verschiedenen Stämme, als auch in deren Passagen auf; das führt zur Variabilität in der Virulenz und eventuell auch zu unterschiedlicher elektrophoretischer Wanderungsgeschwindigkeit des Virus (Bachrach u.a., 1967).

Die MKS-Virusstämme sind immunologisch verschieden. Es werden auf Grund ihrer Antigenität sieben Serotypen unterschieden: und zwar die in Europa und anderen Teilen der Welt vorkommenden 3 klassischen Typen O, A und C sowie die 4 exotischen Typen SAT₁, (South African Territories), SAT₂ und SAT₃, die bisher in Afrika und im Nahen Osten festgestellt worden sind sowie der Typ ASIA₁, den man bisher im Mittleren und Fernen Osten identifiziert hat. Innerhalb eines Serotyps weichen einzelne MKS-Stämme ebenfalls serologisch und immunologisch voneinander ab. Vom World Reference Laboratory für die MKS-Typendifferenzierung in Pirbright sind bisher folgende Subtypen festgestellt und klassifiziert worden: O = 11, A = 23, C = 2 (mit relativ geringen Unterschieden), SAT₁ = 7, SAT₂ = 3, SAT₃ = 4, ASIA₁ = 2 (mit relativ geringen Unterschieden).

Bei der Vermehrung des MKS-Virus entstehen vier Antigene:

- a) das infektiöse aus Nukleoprotein bestehende komplette Viruspartikel mit einer Sedimentationskonstante von 140 S (Bachrach u.a., 1958),
- b) das nicht infektiöse, RNS-freie Partikel mit einer Sedimentationskonstante von 75 S (Graves u.a., 1968),

- e) das nicht infektiöse, aus Euglobulin bestehende S-Antigen (kb-Antigen) mit einer Sedimentationskonstante von 12 S (Trautmann u.a., 1959) und
- d) das "Virus infection associated" (VIA) Antigen, das als funktionelles Frühprotein bei der Virussynthese gebildet wird (Cowan u.a., 1966; Polatnick u.a., 1967).

Die vier Antigene können durch geeignete Methoden isoliert und nachgewiesen werden.

Das MKS-Virus sowie die Rhinoviren unterscheiden sich von den anderen Mitgliedern der Picorna-Gruppe durch ihre Säurelabilität sowie eine hohe Flotationsdichte, die 1.38 - 1.43 g/ml beträgt (Mc Gregor u.a., 1966; Jamison, 1966).

Das Viruspartikel zerfällt bei einem pH unter 6.0 in RNS und Protein (Mussgay, 1959). Dagegen ist das MKS-Virus sehr stabil im alkalischen pH-Bereich und verliert erst bei pH 9.0 schnell seine Infektiosität.

Die MKS-Viren verhalten sich bezüglich der $MgCl_2$ - und NaCl-Wirkung bei der Thermo-inaktivierung anders als die übrigen Mitglieder der Picorna-Virus-Gruppe. Abgesehen von der unterschiedlichen Wirkung beider Salze auf die Thermo-inaktivierung ein- und desselben Virusstammes, spielen die Inaktivierungstemperaturen (50° oder 37° C) sowie typen- und stammesspezifische Einflüsse eine Rolle. Dazu kommt noch, daß die Salzwirkung auf die Thermo-inaktivierung des Virus durch die Temperatur, bei der die Virusstämme bis zum Inaktivierungsbeginn gelagert werden, stark beeinflußt wird. Lediglich zwei charakteristische Ergebnisse ragen heraus: einmal die starke inaktivierungsfördernde Wirkung, die $MgCl_2$ auf die Thermo-inaktivierung der O-Stämme ausübt, und zum anderen die Verstärkung der 37° C-Inaktivierung bei der überwiegenden Mehrzahl der geprüften O₁-, A- und C-Stämme durch NaCl (Wittmann, 1968).

Die Möglichkeit der Inaktivierung des MKS-Virus durch Formalin ist schon seit 1926 bekannt (Vallée u.a., 1926). Die Inaktivierungskurven gehören zur Reaktion II. Ordnung (Graves, 1963).

2. Viruszüchtung

Heske (1930) gelang erstmals die Züchtung des MKS-Virus in Hautgewebe von Meerschweinchenembryonen mit Hilfe der Eintropfengewebekultur.

Später wurde das MKS-Virus unter Anwendung der von Maitland u.a. (1931) beschriebenen Methoden in größerer Menge gewonnen und in verschiedenen Geweben passagiert und diese Art der Viruszüchtung für die Impfstoffherstellung nutzbar gemacht.

Mit der Maitland-Technik wurden folgende Gewebe auf ihre Eignung zur Züchtung des MKS-Virus geprüft: Kälberlungengewebe, Rinderplazenta, Rinderhautgewebe, Zungenschleimhaut vom Rind, trypsinierte Rindernierenzellen, Rinderembryonierenzellen, Kälberhodenzellen und Hamsternierenzellen (BHK₂₁).

Nach der Entwicklung von Einschichtzellkulturen durch Dulbecco (1952), Dulbecco und Vogt (1954) und Younger (1956) konnten Sellers (1955) und Bachrach u.a. (1955) als erste das MKS-Virus in Kälber- und Ferkelnierenzellen zur Vermehrung bringen. Sie analysierten dabei den zytopathogenen Effekt des Virus in diesen Kulturen. Auch andere Zellkulturen eignen sich in Form der Einschichtzellkulturen zur MKS-Virus-Züchtung: Zungenepithel-, Hautepithel- und Nierenzellen von Kälbern, Nieren von Rinderembryonen und aus Rinderamnion, Lammnierenzellen, Mäusemammarcarzinom, der Haut und der Muskulatur des Rindes, embryonales Rinderlungen- und -herzgewebe, fötale Kaninchenlunge, Kaninchennieren, Ziegennieren, Schafnierenzellen, Kälberhodenzellen, Mäusenieren, Mäusepankreas, embryonale Schweinenieren, Katzennieren (Literatur bei Röhrer, 1967), der permanente Zellstamm (Fibroblasten) von Hamsternierenzellen BHK₂₁ Klon 13 (Mowat u.a., 1962) und Kälberschilddrüsen (Snowdon, 1966).

3. Empfindlichkeit verschiedener Testsysteme

Die vergleichende Titration des MKS-Virus im Rind, Schwein, in der Maus und in Gewebekulturen hat bewiesen, daß die Gewebekul-

turen ein sehr empfindliches Testsystem für die Virustitration sind, und daß die relative Empfindlichkeit zwischen den verschiedenen Systemen abhängig vom Virus ist.

Skinner (1951) berichtete bei Titrationen des MKS-Virus in Mäusen (Infektion intraperitoneal) und in Rindern über eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse. Im Rahmen der Entwicklung von Titrationmethoden für das MKS-Virus entweder durch den Nachweis von komplementbindendem Antigen (Brooksby u.a., 1954), Plaquetchnik in Einschichtzellkulturen (Sellers, 1955) oder durch die ZPE-Technik (Bachrach u.a., 1955) wurde die Eignung der Gewebekulturen für die Titration des MKS-Virus festgestellt.

Unter Zugrundelegung der Zytopathogenität als Maßstab der Infektion von primären Kälbernierenzellen fand Mackowiak u.a. (1958), daß die Titration der Typen O, A und C des MKS-Virus in Gewebekulturen einen höheren Titer ergibt als die Titration in Baby-mäusen.

Kuwert u.a. (1959) titrierten 18 MKS-Stämme in primären Rindernierenkulturen und in Rindern und fanden, daß 14 der 18 Stämme in Gewebekulturen einen geringgradig höheren Titer als in Rindern hatten und umgekehrt bei den restlichen 4 die Titration in Rindern höhere Titer ergab.

Kobusiewicz u.a. (1965) titrierten MKS-Virus der Typen O und C intradermolingual (Methode Henderson) und in Schweinenierenzellen und kamen zu der Feststellung, daß die Titration in Schweinenierenzellen höhere Titer als in Rindern ergab.

Cottral u.a. (1965) stellten bei vergleichenden Titrationen von 19 MKS-Stämmen in Rindern, Mäusen, Meerschweinchen und Rindernierenzellkulturen fest, daß die Gewebekulturen zum Virusnachweis für 10 Virusstämme die gleiche Empfindlichkeit hatten wie Rinder, für 9 Stämme eine höhere Empfindlichkeit als Rinder, eine höhere als Mäuse für 11 und die gleiche wie Mäuse für 8 Stämme. Die Rinder waren für 5 Stämme empfindlicher als Mäuse und die Mäuse bei 6 Stämmen empfindlicher als Rinder. Die verbleibenden 8 Virusstämme wurden mit annähernd gleichen Titerwerten in Rindern und Mäusen nachgewiesen. Meerschweinchen waren gegenüber den anderen drei

Testsystemen am wenigsten empfindlich.

Patty u.a. (1965) ermittelten in Versuchen mit 12 Stämmen der 7 MKS-Typen bei intradermolingualer Infektion von Rindern, intraperitonealer Infektion von Mäusen und Plaquebildung in Kälbernierenkulturen als Maßstab für die Infektiosität, daß die niedrigsten Infektiositätstitern in Mäusen gefunden wurden. Die Titer in Rindern waren viermal höher als in Mäusen, der höchste Virusgehalt wurde in Zellkulturen gefunden und war hier 2.5 mal höher als in Rindern und 11 mal höher als in Mäusen.

Snowdon (1966) titrierte Rinder-MKS-Virus in Kälberschilddrüsenkulturen mittels ZPE-Technik sowie in Rindern und Mäusen. Er fand, daß die Kälberschilddrüsenzellen einen höheren Titer als die Rinder und die Mäuse erbrachten.

Jetzt werden Titrations des MKS-Virus zumeist in Gewebekulturen durchgeführt. Hierbei ist der Grad der Empfindlichkeit jedes Zellsystems abhängig von der Herkunft und vom Typ des Virus.

Sellers u.a. (1959) untersuchten das Verhalten verschiedener MKS-Stämme vom Rind, Schwein, Maus, Meerschweinchen, Hühnerembryo und Gewebekulturen in Nierenzellkulturen von Schwein, Kalb, Rind und Lamm. Sie fanden, daß alle diese Virusstämme mit mehr oder weniger starkem ZPE sowohl in Schweine- als auch in Lammnierenkulturen gezüchtet werden konnten. Dagegen vermehrten sich attenuierte MKS-Stämme vom Rind in Kälber- und Ochsennierenzellkulturen in geringerem Maße mit abnehmender zytopathogener Aktivität. Das zeigt, daß Gewebekulturen von Rinderzungenepithel, Ochsen- und Kälbernieren als brauchbare Testsysteme zum Nachweis abgeschwächter Infektiosität für Rinder benutzt werden können.

Wesslen u.a. (1956) titrierten verschiedene MKS-Stämme von Zungenepithel infizierter Rinder, die zum Teil ein bis zweimal in Kälbernierenzellen passagiert worden waren, in Rinderzungenepithel-, Haut- und Nierenzellkulturen und stellten fest, daß die Empfindlichkeit der Nierenzellkulturen gleich und geringgradig höher als die der Zungenepithelkulturen waren.

Mayr u.a. (1960) beobachteten nach 450 Dauerpassagen des MKS-Virus in Gewebekulturen von Schweine-, Kälber- und Mäusenieren, daß

solche Virusdauerpassagen in Schweinenieren zu einer starken Virulenzabnahme führten. Die Dauerpassagen des MKS-Virus in Kälbernierenkulturen führt zu keinem Verlust der zytopathogenen Aktivität gegenüber Schweinenierenzellkulturen, zu einem geringen Abfall in Mäusenierenkulturen und zu einem Abfall des ZPE in Kälbernierenkulturen, ein Befund, der mit den Ergebnissen von Sellers u.a. (1959) übereinstimmt.

Snowdon (1966) stellte fest, daß Kälberschilddrüsenkulturen das empfindlichste System für die Titration von nicht modifiziertem Rindervirus sind. Die höhere Empfindlichkeit dieses Zelltyps im Vergleich zu BHK- und sekundären Schweinenierenkulturen konnte durch 1.4 bis 1.8 log höhere Titer bewiesen werden.

4. Geschichte der MKS-Vakzine

Die Entwicklung von Impfstoffen aus inaktivierten Erregern geht auf die Entdeckung zurück, daß Diphtherie- und Tetanus-Toxin unter gleichzeitiger Einwirkung von Wärme und Formalin in eine ungiftige Substanz - das Toxoid - umgewandelt werden können (Ramon, 1922). Vallée u.a. (1926) zeigten dann, daß auch das MKS-Virus nach Zugabe von Formalin unter Beibehaltung seiner Immunisierungsfähigkeit inaktiviert werden kann. Diese Erkenntnis und die Versuche von Schmit-Jensen u.a. (1936) führten Waldmann und Köbe (1938) zur klassischen MKS-Formalin-Adsorbat-Vakzine, die mit der Entdeckung von Pyl (1953) und Pyl und Möhlmann (1954), daß MKS-Virus chloroformstabil ist, zur Konzentrat-Vakzine weiterentwickelt wurde.

Frenkel (1947) nutzte als erster die Möglichkeit der Gewebekulturtechnik aus und produzierte eine Vakzine aus Rinderzungenepithel-Suspensionskulturen. Schließlich haben die Befunde von Bachrach (1955) und Sellers (1955) über die Vermehrung des MKS-Virus in Primärgewebekulturen aus Kälbernieren und Schweinenierenepithelien die Herstellung von Gewebekulturvakzinen erlaubt, deren Verfahren zur Großproduktion von Ubertini, Nardelli u.a. (1960), beschrieben wurde.

Die Wirkungsweise des Formalins sowohl auf das MKS-Virus als auch bei anderen Viren ist noch nicht vollkommen bekannt, doch ist bewiesen, daß das Virusprotein und auch die Virusnukleinsäure besonders in ihren Amino-imino-amido- und sulfhydryl-Gruppen betroffen sind (Bachrach, 1966).

Der Verlauf der Inaktivierungskurve des MKS-Virus durch Formalin wurde durch Titrationsen in Babymäusen (Brown u.a., 1963) und in Rindernierenzellkulturen (Wesslen und Dinter, 1957; Bachrach u.a., 1957; Graves, 1963) bestimmt und es wurde ermittelt, daß bei zunehmender Inkubationszeit eine Verlangsamung der Inaktivierungsreaktion eintritt. Die Inaktivierungsrate stimmt mit der Formel überein, die Gard (1957) für das Pol.omyelitis-Virus ermittelt hat.

Eine der gegenwärtig gebräuchlichen Methoden zum Nachweis von restaktivem Virus in formalininaktivierten MKS-Vakzinen (Unschädlichkeitsprüfung) ist, wie in der Einleitung dargestellt, die intradermolinguale Injektion des Impfstoffes an Rinder.

Obwohl die meisten der bisher untersuchten für die Anwendung in der Praxis vorgesehenen Vakzinen unschädlich waren, besteht doch weiterhin der Verdacht, daß sich kleine Mengen von restaktivem Virus der Entdeckung bei dieser Art der Prüfung entziehen (Möhlmann, 1952; Moosbrugger, 1948).

Der Nachweis von restaktivem MKS-Virus in lyophilisierten MKS-Vakzinen gelang Girard und Mackowiak (1949). Dieses Virus war für empfängliche Rinder voll virulent. Michelsen (1951) konnte im Tierversuch an Rindern 2 - 8 Wochen post vaccinationem (p.v.) und im Meerschweinchen infektiöses Virus des zur Vakzineherstellung verwendeten homologen Typs feststellen. Die Impfung mit der 1 bis 1 1/2 Jahre alten Vakzine hatte sowohl bei Rindern als auch bei Meerschweinchen zur MKS-Erkrankung geführt. Merettig (1957) konnte restaktives Virus noch aus sieben Jahre alten Adsorbatimpfstoffen durch i.p. Injektion von Babymäusen nachweisen.

Über die Isolierung von infektiösem MKS-Virus aus Natur- und Frenkel-Kulturvirus-Vakzinen berichtete Schneider (1955). Die mit dem isolierten MKS-Virus vom Typ O₂ intradermolingual infi-

zierten Rinder erkrankten klinisch nicht mehr.

Einen indirekten Beweis für das Vorhandensein von infektiösem MKS-Virus in Totvakzinen lieferte Pehl (1951), als er in der Zungenschleimhaut intrakutan vakzinierter Ferkel 48 Stunden p.v. histologisch Leukozyteninfiltrate feststellte, die er als abortive MKS-Erkrankung deutete.

Graves (1963) berechnete, daß bei Zusatz von 0.1% Formalin und 11-tägiger Inkubation bei 22° C noch etwa 1 ID₅₀ infektiöses Restvirus pro Liter Impfstoff enthalten wären (Ausgangstiter 10^{7.0} ID₅₀/ml).

Zur Klärung der Frage, ob Gewebekulturen für den Nachweis von restaktivem Virus in inaktivierten MKS-Impfstoffen geeignet sind und damit zur weiteren Absicherung des Begriffes "frei von MKS-Virus" in die Unschädlichkeitsprüfung eingebaut werden sollen, wurden die folgenden eigenen Untersuchungen durchgeführt.

C. Material und Methoden

1. Virusstämme

Für die Untersuchungen wurden die folgenden MKS-Virusstämme aus der Sammlung der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen verwendet:

- O₂- Brescia in der 7. Rinder-Passage,
- O₇- Italien in der 2. Rinder-Passage,
- O₁- Kaufbeuren in der 3. Rinder-Passage,
- A₅- Westerwald in der 18. Rinder-Passage und
- C- Riems in der 10. Rinder-Passage.

2. Lösungen

Hank'sche Lösung nach Hanks und Wallace (1949) als Lösungsmittel für Laktalbumin und als Mediumbestandteil für das Anzuchtmedium für Schweinenierenkulturen.

Earle'sche Lösung nach Earle (1943) als Mediumbestandteil für Anzucht-, Wachstums- und Erhaltungsmedium für Kälbernieren-, Schweinenieren- und Permanentzellkulturen.

Phosphatpufferlösung (PBS) nach Dulbecco und Vogt (1954) für Virusverdünnungen und zum Waschen der Zellkulturen vor der Virusbeimpfung.

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, pH 7.2, die frei von Mg- und Ca-Ionen war, für die Verreibung des Aphthenmaterials.

Zur Gewinnung von Zellen aus Organen wurden Gewebestückchen mit 0.25%iger Trypsinlösung (Difco 1:250) in PBS ohne Mg- und Ca-Ionen angedaut. Zur Herstellung von Kälberschilddrüsenkulturen benutzten wir 0.45%ige Trypsinlösung, pH 7.4, nach Flowright und Ferris (1961) und zur Trypsinierung von Permanentkulturen eine Trypsin-Versenlösung, die aus 1 Teil 0.25%iger Trypsinlösung und aus 4 Teilen einer 0.02%igen Versenlösung in PBS (Mg- und Ca-Ionen frei) bestand.

Laktalbuminhydrolysat als 5%ige Lösung in Hank'scher Lösung ohne

NaHCO₃-Zusatz für die Mediumherstellung.

Tryptosephosphat als 2.95%ige Lösung in Aqua dest. für das Medium zur Züchtung der Kälberschilddrüsenzellen.

Im Medium zur Züchtung der BHK-Zellen war eine 1%ige Lösung von Hefe-Extrakt (Difco) enthalten.

Phenolrot gelangte in Form einer 0.1%igen Stammlösung nach Parker (1950) als Indikator in den Gewebekulturmedien zur Anwendung.

Zur pH-Einstellung der Probeimpfstoffe wurde Glykokol-Puffer, pH 9.6, nach Pyl u.a. (1954) benutzt, zur Inaktivierung der Impfstoffe Formalin als Formaldehydlösung (35 Gew.%) der Firma Merck A.G., Darmstadt, und zur Neutralisation des Formalins eine NaHSO₃-Lösung.

Aluminiumhydroxyd gelangte bei der Impfstoffherstellung 2%ig zur Anwendung.

Bei Elutionsversuchen wurde mit 1/3 m Phosphatpuffer, pH 7.5, nach Matheka (1959) gearbeitet.

Als Dialyse-Puffer diente Tris-Phosphat-Salzlösung.

3. Zellkulturen

Die Untersuchungen sind ausschließlich mit primären Zellkulturen von Kälbernieren, Schweinenieren, Kälberschilddrüsen und mit Permanentkulturen des Zellstammes BHK₂₁/Klon 13 durchgeführt worden.

Folgende Herstellungsmethoden wurden angewendet:

- a.) Primäre Kälbernierenzellkulturen (ENK) nach dem Trypsinierungsprinzip von Dulbecco und Vogt (1954) und Younger (1952) in der Modifizierung von Bachrach u.a. (1955) und Patty (1965) unter Verwendung von Earle'scher Lösung im Medium.
- b.) Primäre Schweinenierenzellkulturen (ENS) nach der Modifikation von Mayr und Schwöbel (1956) des von Dulbecco (1952) angegebenen Verfahrens. Als Anzuchtmedium diente Hank'sche Lösung, die nach dreitägiger Bebrütung bei 37° C durch Wachstumsmedium mit Earle'scher Lösung ersetzt wurde, als Erhaltungsme-

dium das Wachstumsmedium ohne Serumzusatz.

- c.) Primäre Kälberschilddrüsenkulturen (ESK) wurden nur mit geringer Modifikation nach der von Plowright und Ferris (1961) bzw. Snowdon (1966) beschriebenen Methoden hergestellt.

Von Kehlköpfen frisch geschlachteter Kälber wurden nach Reinigung unter fließendem Wasser die unverletzten Schilddrüsen ohne Verletzung der Kapsel abpräpariert. Danach wurden die Schilddrüsenkapsel, das Fett und die Blutgefäße entfernt und der säuberlich präparierte Schilddrüsenkörper in toto in PBS-Lösung mit Antibioticazusatz (Penicillin 500 I.E./ml, Streptomycin 200 mg/ml) eingelegt und 40 Minuten im Wasserbad bei 37° C gehalten. Anschließend wurde das Schilddrüsen Gewebe fein zerkleinert und 2 - 3 mal in PBS gewaschen. Die Gewebestückchen wurden dann 20 Minuten mit angewärmter (33° C) Trypsinlösung auf einem Magnetrührer vortrypsiniert. Der Überstand wurde verworfen und durch 250 - 300 ml neues vorgewärmtes Trypsin ersetzt, Trypsinierungszeit 40 Minuten bei 37° C, danach Filtration des gewonnenen Überstandes und noch zweimalige Wiederholung der Trypsinierung. Die filtrierten Überstände wurden bei 37° C im Wasserbad gehalten, da dadurch eine bessere Zellausbeute festgestellt wurde. Die gesammelten Zellsuspensionen wurden dann 5 Minuten bei 550 g/Minute zentrifugiert, das Sediment in 10 ml MKS-antikörperfreiem Kälberserum aufgenommen und nochmals zentrifugiert. Danach erfolgte Resuspension des Zellsediments in 10.0 ml Anzuchtmedium und Bestimmung der Zellzahl.

Die Ausgangszellsuspension wurde mit Anzuchtmedium soweit verdünnt, daß bei der Aussaat der Zellen eine Konzentration von etwa 500 000 pro ml vorhanden waren. Die Verarbeitung von 5 - 6 Schilddrüsen erbrachte meist 5×10^8 Zellen, die für den Ansatz von einem Liter Medium ausreichten.

Als Anzuchtmedium diente ein von Polatnick und Bachrach (1964) modifiziertes Eagle-Medium mit Zusatz von 10% einer 5%igen Laktalbuminlösung, 10% Tryptosephosphat und 10% Kälberserum, sowie Antibiotica in üblicher Konzentration. Nach 3-tägiger

Bebrütung wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. In der Regel waren die Zellen am 6. - 7. Tag nach der Aussaat zu einem dichten Zellrasen ausgewachsen, wobei ein hoher Anteil von Epithelzellen beobachtet wurde.

Als Erhaltungs- und Virusmedium bewährte sich Earle'sche Lösung mit 10% einer 5%igen Laktalbuminlösung.

d.) Permanente Zellkulturen Stamm BHK₂₁ / Klon 13.

Es wurden zwei Zellstämme verwendet, der eine stammte von Stocker und hatte in der BFA etwa 230 Subpassagen durchlaufen; der zweite Zellstamm stammte aus dem Institut Francais de la Fièvre Aphtheuse (IFFA), Lyon, und lag in der 80. Passage in der Anstalt vor.

Als Anzuchtmedium diente Earle'sche Lösung mit 20% einer 5%igen Laktalbuminlösung, 20% Kälberserum, 0.5% einer 1%igen Hefeextraktlösung, 0.1% einer 5%igen Natriumbikarbonatlösung, sowie den üblichen Antibioticazusätzen. Das gleiche Medium ohne Serumzusatz diente als Virusmedium.

4. Virus-Passagen

Für die Anzüchtung der MKS-Virusstämme O₂-Brescia, A₅-Westerwald und C-Riems in Schweinenierenzellkulturen wurden jeweils 10 Kulturröhrchen mit einer 10%igen Virussuspension aus zerriebenen Rinderaphtendeckenmaterial beimpft. Die Animpfdosis pro Röhrchen betrug 0.2 ml. Die Bebrütung der beimpften Kulturröhrchen erfolgte bei 37° C im Rollerverfahren. Die Kulturen wurden mehrmals täglich mikroskopisch beobachtet und zwar in den ersten vier Passagen über einen Zeitraum von 6 Tagen, ab der fünften Passage 4 Tage. Kam es zu einer spezifischen Zellzerstörung, so wurden die Röhrchen auf dem Höhepunkt des zytopathischen Effektes (ZPE) dreimal bei etwa -30° C eingefroren, bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut und anschließend bei 2 200 g 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand diente als Ausgangsmaterial für die nächste Viruspassage (der Rest wurde bei -65° C gelagert). Ab der fünften Passage wurde der virushaltige Überstand auf dem Höhepunkt

des ZPE für die nächste Passage sofort weiterverimpft. Jeder der drei genannten Virusstämme wurde auf diese Weise bis zur 26. Passage in ENS-Kulturen passagiert.

Bei dem Virusstamm A₅-Westerwald ergaben sich einige Schwierigkeiten, da es meistens nur bei der ersten Passage zu einem schwach spezifischen ZPE kam, der bei den weiteren Passagen verschwand.

Um diesen Virusstamm an die ENS-Kulturen zu adaptieren, wurden folgende Maßnahmen durchgeführt:

- a.) Adsorption des Virus in einem Zeitraum von 90 Minuten bei der zweiten Passage.
- b.) Zusatz von Aktinomycin D ($0.05 \mu\text{g/ml}$) zum Erhaltungsmedium. Nach 4-stündiger Einwirkungszeit auf die Zellen, Beimpfung mit 0.2 ml Virussuspension der 1. Passage. Dieses Verfahren wurde auch bei den beiden weiteren Passagen angewendet.
- c.) Von der Virussuspension der ersten Passage wurden jeweils 0.5 ml pro Röhrchen weiterverimpft und genauso weitere Passagen durchgeführt. Bereits in der 3. Passage wurde ein 50 - 75%iger ZPE festgestellt, und ab der 5. Passage genügte für die weiteren Passagen wieder die andere Technik mit einer Animpfdosis von 0.2 ml pro Röhrchen.

Für die Passagen der Virusstämme O₁-Kaufbeuren und O₇-Italien auf BHK-Kulturen wurde zuerst das Rinderaphtenvirus zweimal auf ENS-Kulturen passagiert und anschließend auf BHK-Kulturen gebracht, die stationär bebrütet wurden. Auch diese Kulturen wurden täglich auf das Vorhandensein eines ZPE untersucht und bei Feststellung eines 50%igen ZPE eingefroren, wieder aufgetaut, zentrifugiert und die Virussuspension bei -65°C gelagert.

5. Virustitrationen

Zur Bestimmung der mittleren kulturinfektiösen Dosis (KID_{50}) des MKS-Virus auf den verschiedenen Zellkulturen wurden sämtliche Proben in Potenzen von 10 (wenn nicht anders erwähnt) in Earle'scher Salzlösung verdünnt. Von jeder Verdünnung wurden 4 bzw. 5

bis 10 Kulturröhrchen mit je 0.2 ml beimpft und im Roller bei 37° C bebrütet. Die erste Ablesung der Kulturen erfolgte 18 Stunden p.i. und folgender täglicher 2 bis 4 maliger Beobachtung auf einen ZPE. Die Beobachtungszeit erstreckte sich vom 4. bis zum 6. Tage p.i. Die Endtiter wurden nach Kärber (1931) berechnet, sie beziehen sich alle auf 1.0 ml.

6. Nachweis von bestimmten Virusmengen

Für diese Versuche wurde der MKS-Virusstamm A₅-Westerwald, 26. ENS-Passage, benutzt. Das Virus wurde auf ENS-Kulturen titriert. Das Ziel dieses Versuches war es zu prüfen, in welchen Gewebekulturen geringe Mengen des Virus unter verschiedenen Bedingungen nachgewiesen werden können. Diese Bedingungen waren:

- a.) Zelltyp und Zuchtgefäße,
- b.) mit oder ohne Adsorption des Virus an das Zellsystem.

Bei Fehlen eines ZPE wurden Subpassagen in homologen und heterologen Zellkulturen zum Virusnachweis durchgeführt.

Als Gewebekulturen wurden primäre Kulturen von ENS, ENK, ESK und Subkulturen von BHK₂₁ verwendet. Die Züchtung erfolgte in Rouxschalen, Vierkantflaschen und Röhrchen.

Geprüft wurden Viruskonzentrationen von 100, 10, 5 und 0.4 KID₅₀ in einer Animpfdosis von 5.0 ml für die Rouxschalen und von 1.0 ml für die Vierkantflaschen. Außerdem wurden 1 und 0.5 KID₅₀, die in 0.2 ml Animpfdosis enthalten waren, in Röhrchen geprüft. Zur Adsorption wurde das Virus 90 Minuten bei 37° C auf den Kulturen gehalten.

7. Dosis-Wirkungs-Kurve (DWK)

Zur Feststellung des Empfindlichkeitsunterschiedes zwischen Schweinenieren- und Kälberschilddrüsen-Kulturen wurden die Virusstämme O₂-Brescia (7. Rinder-Passage), A₅-Westerwald (26. ENS-Passage) und C-Riems (5. ENS-Passage) verwendet. Vorversuche mit den drei Stämmen dienten der Feststellung der ungefähren Titer-

höhe in beiden Zellkulturarten. Für die Hauptversuche wurden von jeder Virussuspension Verdünnungsreihen mit dem Verdünnungsfaktor 2 derart angelegt, daß jeweils 13 Verdünnungsstufen hergestellt wurden. Die Beimpfung der beiden Kultursysteme erfolgte gleichzeitig mit 0.2 ml pro Röhrchen, 10 Röhrchen pro Verdünnungsstufe und anschließender Bebrütung bei 37° C im Rollerverfahren. Nach der Infektion der Kulturen wurden diese täglich 2 bis 4 mal mikroskopisch untersucht. Für die positive Bewertung war ein spezifischer ZPE maßgebend. Die Schlußablesung wurde am 4. bzw. 6. Tag p.i. durchgeführt. Jeder Versuch wurde zwei- oder dreimal durchgeführt. Zur Berechnung des Empfindlichkeitsunterschiedes (Differenz zweier Infektiositätstiter) diente die Probitanalyse (Cavalli-Sforza, 1964).

8. Formalin-Inaktivierungsversuche

a.) Virusstämme

Zu den Inaktivierungsversuchen wurden die MKS-Virusstämme O₁-Kaufbeuren und O₇-Italien herangezogen. Als Virussuspension für die Versuche diente die Virusernte der BHK-Kulturen aus Rouxschalen. Die Kulturen wurden zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden 5.0 ml Virussuspension mit 10⁶ KID₅₀/ml zugegeben und 90 Minuten adsorbiert. Anschließend wurde jede Schale mit 60.0 ml Virusmedium aufgefüllt. Die Kulturen wurden, nachdem ein 100%iger ZPE beobachtet wurde, zweimal eingefroren, wieder aufgetaut und 10 Minuten bei 2 200 g zentrifugiert und danach die Virussuspensionen in Mengen von 500.0 ml abgefüllt und bis zum weiteren Gebrauch bei -65° C gelagert.

b.) Inaktivierungsversuche

Sie wurden auf zwei verschiedene Arten mit je 500.0 ml Virussuspension durchgeführt.

Erster Versuch: Formalin-Endkonzentration 1:4 000; Wasserstoffionenkonzentration eingestellt auf pH 7.0; Inaktivierung im Wasserbad bei 26° C.

Zweiter Versuch: Formalin-Endkonzentration 1:2 000; pH-Wert mit Hilfe von Glykokoll-Puffer auf pH 8.0 eingestellt; Inaktivierung bei 26° C im Wasserbad.

c.) Titration

Unmittelbar nach der Formalinzugabe sowie im 24-stündigen Abstand wurden aus den Inaktivierungsgefäßen je 20.0 ml Virussuspension entnommen und das Formalin durch Zugabe von 0.2 ml einer 5.83%igen (bei Verdünnung 1:4 000) bzw. 12.07%igen (bei Verdünnung 1:2 000) NaHSO_3 -Lösung neutralisiert. Die Inaktivierungsgeschwindigkeit wurde durch Titrationen in ENS- und ESK-Kulturröhrchen ermittelt. Verdünnungsreihen wurden in Zehnerpotenzen abgestuft und je 4 Röhrchen (je Zelltyp) pro Verdünnungsstufe beimpft. Die Impfdosis pro Röhrchen betrug 0.2 ml. Die Röhrchen wurden bei 37° C im Rollerverfahren bebrütet, Schlußablesung immer am 6. Tag p.i. Die Berechnung des jeweiligen Restinfektiositätstiters erfolgte nach dem Verfahren von Kärber (1931).

9. Formalin-Inaktivierungsversuche von MKS-Adsorbatimpfstoffen

Zur Herstellung von MKS-Adsorbatimpfstoffen dienten 250.0 ml einer O_1 -Kaufbeuren-Virussuspension (9. BHK-Passage). Die Virussuspension wurde mit der gleichen Menge (1:1) einer 2%igen $\text{Al}(\text{OH})_3$ -Lösung versetzt und eine Stunde bei +4° C geschüttelt. Die anschließende Inaktivierung mit einem Formalinzusatz von 1:2 000 erfolgte wie unter 8 b beschrieben. Es sollte ermittelt werden, ob nach verschiedenen Inaktivierungszeiten noch aktives Virus nachweisbar war. Stichproben in einem Volumen von 100.0 ml wurden 1, 2, 5 und 10 Tage nach dem Formalinzusatz entnommen. Diese Proben wurden 15 Minuten bei 2 200 g zentrifugiert, das erhaltene Sediment in 20.0 ml $\frac{1}{3}$ m Phosphatpuffer resuspendiert, gut durchgemischt, eine Stunde bei +4° C geschüttelt und dann 15 Minuten bei 2 200 g wieder zentrifugiert. Der jetzt gewonnene Überstand diente als Ausgangsmaterial für den Virusnachweis. Er wurde entweder unverdünnt oder 1:4 mit PBS verdünnt in einer Menge von 0.05 ml auf Gewebekulturröhrchen von ENS und ESK verimpft.

10. Vakzine-Prüfung

Monovalente sowie trivalente industriell hergestellte und aus dem Handel bezogene MKS-Adsorbat-Vakzinen verschiedener Hersteller und Herstellungsdaten wurden auf ihren Gehalt an aktivem Restvirus geprüft. Hierzu bedienten wir uns des von Matheka (1959) beschriebenen Verfahrens. Die zwei Eluate und der beim ersten Waschvorgang erhaltene Überstand wurden zusammengesammelt und durch Vakuumdialyse im Visking-Dialyseschlauch 8/32 auf 1/25 ihres ursprünglichen Volumens eingeeengt. Als Dialyse-Puffer diente Tris-Phosphat-Pufferlösung. Das so erhaltene Konzentrat wurde auf Infektiosität in ENS und ESK-Kulturen geprüft.

D. Ergebnisse

1. Virus-Passagen

Die MKS-Virusstämme O₂-Brescia und C-Riems ließen sich auf ENS-Gewebekulturen gut und rasch adaptieren. Beim O₂-Stamm trat in der zweiten Passage ein 100%iger ZPE 48 Stunden p.i. auf, der sich nach der 4. Passage bereits 18 Stunden p.i. zeigte. Demgegenüber konnte ein 100%iger ZPE in einem Zeitraum von 18 Stunden p.i. beim Stamm C-Riems erst nach der 6. ENS-Gewebekulturpassage beobachtet werden.

Der A₅-Westerwald-Virusstamm verhielt sich völlig anders. Er zeigte bei der ersten Passage in ENS-Kulturen einen nur sehr schwachen ZPE, der nach einer weiteren Passage sogar gänzlich verschwand. Mit Hilfe der Adsorptionsmethode und Zusatz von Aktinomycin D in weiteren 4 Kulturpassagen konnte ein sichtbarer ZPE ebenfalls nicht erreicht werden. Gab man hingegen den A₅-Stamm im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Versuch, in dem die Animpfdosis 0.2 ml pro Röhrchen betrug, in einer Dosis von 0.5 ml auf jedes Röhrchen, so zeigten drei von zehn beimpften Röhrchen einen ZPE. Wurden von diesen positiven Röhrchen wiederum 0.5 ml auf neue Gewebekulturröhrchen weiter verimpft, dann zeigten alle Röhrchen einen ZPE. Ab der 4. Passage wurde dann immer eine 75- bis 100%ige Zellzerstörung im Zeitraum von 24 bis 36 Stunden p.i. beobachtet, ab der 6. Passage trat eine 100%ige Zellzerstörung schon nach 10 Stunden mit einer Impfdosis von 0.2 ml pro Röhrchen auf.

2. Titration von ENS-adaptiertem MKS-Virus in ENS- und ESK-Kulturen

Hierbei wurden die Veränderungen der Virustiter (Virulenz) bei zunehmender Adaption an Schweinenierenzellen geprüft. Als Grad der Virulenz galt der Titer in ENS- und ESK-Kulturen.

Aus der Darstellung der Virustiter in der Tabelle 1 wird ersichtlich, daß in der Titerentwicklung in ENS- und ESK-Kulturen bedeu-

tende typ- und stammesspezifische Unterschiede auftreten. Über-einstimmend ist festzustellen, daß alle drei verwendeten Stämme niedriger ENS-Passagezahl die höchsten Titer in ESK-Kulturen hatten. Die ermittelten Titer-Differenzen zwischen ENS und ESK betrugen 0.5 bis 1.3 log und müssen damit als signifikant gelten. Bei zunehmender Adaption bis zur 26. ENS-Passage wird ein unterschiedliches Verhalten der drei MKS-Stämme sichtbar.

Tabelle 1

Virus Typ, Stamm	Virus Passage	Titer log KID ₅₀ /ml	
		ENS	ESK
Typ A A ₅ -Westerwald	9. ENS-Passage	5.7	6.2
	19. ENS-Passage	5.7	6.5
	26. ENS-Passage	5.0	6.9
Typ C C-Riems	5. ENS-Passage	4.4	5.7
	19. ENS-Passage	5.2	5.5
	26. ENS-Passage	5.95	5.95
Typ O O ₂ -Brescia	7. Rd.-Passage	5.0	6.1
	2. ENS-Passage	4.2	4.95
	5. ENS-Passage	5.45	5.45
	26. ENS-Passage	6.45	5.45

Titration von ENS adaptierten MKS-Virusstämmen
auf ENS und ESK.

Bei dem A₅-Westerwald-Stamm konnte durch Titration in ESK-Kulturen ein Titeranstieg von 0.7 log erreicht werden. Bei der Titration in den homologen ENS-Kulturen kam es zu einem Titerabfall von 0.7 log. Aus den Titerangaben der Tabelle 1 geht hervor, daß die Titersteigerung in ESK von der 9. bis 26. ENS-Passage kontinuierlich erfolgt. In den ENS-Kulturen dagegen bleibt der Virustiter zwischen der 9. und 19. ENS-Passage konstant und fällt dann auf 5.0 log ab.

Die zunehmende Adaption des A₅-Virus an ENS-Kulturen wird vor allem bei einem Titrationsvergleich zwischen ENS und ESK deutlich. Der mit der 9. ENS-Passage erreichte Titer in ENS und ESK unterscheidet sich um 0.5 log. Dieser Unterschied beträgt in der 19. Passage 0.8 log und erreicht in der 26. Passage 1.9 log.

Bei der Titration des MKS-Stammes C-Riems in ESK-Kulturen wurden zwischen der 5. und 26. ENS-Passage nur unerhebliche Titerdifferenzen ermittelt. Es bleibt festzustellen, daß nach der angegebenen Passagezahl in ESK kein Titeranstieg zu erreichen war. Die Befunde bei der Titration in ENS dagegen zeigen, daß die fortlaufende Passagierung des C-Riems-Stammes zwischen der 5. und 26. ENS-Passage zu einem kontinuierlichen Titeranstieg von 1.5 log führt. Dabei fällt auf, daß die ersten Kulturpassagen in ENS gegenüber ESK einen deutlich geringeren Titer zeigen; in der 26. ENS-Passage besteht kein Unterschied mehr.

Das als Ausgangsmaterial für die Passagierung des O₂-Brescia verwendete Rinderaphthenvirus erreichte in ESK zunächst einen Titer von 6.1 log, der nach Adaption in der 2. ENS-Passage dann durch Titration in ESK um 1.2 log auf 4.95 absank. Durch weitere Adaption in ENS wurde zwischen der 2. und 5. Kulturpassage ein Titeranstieg von 0.5 log erreicht, der auch durch weitere Passagierung nicht mehr zu steigern war. Es scheint also, daß im angegebenen Passagebereich offenbar nur eine ungenügende Adaption erfolgte. Der für die ESK-Kulturen festgestellte Titerabfall zwischen der 7. Rinder-Passage und der 2. ENS-Passage kann auch für ENS-Kulturen konstatiert werden. Jedoch führt die weitere Kultivierung des O₂-Brescia-Stammes zwischen der 2. und 5. ENS-Passage zu einer Titersteigerung von 1.25 log. Durch weitere 20 Kulturpassagen erreichte dieser Stamm dann in der 26. ENS-Passage einen Titer von 6.45 KID₅₀. Durch dieses Verhalten unterscheidet sich der O₂-Brescia-Stamm deutlich von dem A₅-Westerwald- und C-Riems-Stamm. Im Gegensatz zu den A₅- und C-Riems-Stämmen zeigten die ENS-Kulturen für gewebekulturadaptiertes O₂-Brescia-Virus eine deutlich höhere Empfindlichkeit als ESK.

3. Nachweis von bestimmten Virismengen

Um die Empfindlichkeit verschiedener Zelltypen gegenüber MKS-Virus zu prüfen wurden ENS-, ENK-, ESK- und BHK₂₁-Kulturen mit abgestuften Virismengen des MKS-Virus A₅-Westerwald (26. ENS-Passage) infiziert. In den einzelnen Versuchsgruppen wurden 100, 10, 5 und 0.4 KID₅₀ in Vierkantflaschen und Rouxschalen inokuliert sowie 1 und 0.5 KID₅₀ als Impfdosis in Röhrenkulturen benutzt.

Aus Tabelle 2 ist ersichtlich, daß eine Infektion mit 100 KID₅₀ in allen Kulturen eine Virusvermehrung hervorruft. Unterschiede sind allein im Grad und im zeitlichen Auftreten des ZPE gegeben. Auch bei Inokulation von 10 KID₅₀ kann noch eine deutliche Virusvermehrung in ENS-Kulturen innerhalb von 36 Stunden gesehen werden. In ENK- und BHK-Kulturen ist ein besserer Nachweis nur möglich, wenn das Virus zuvor an die Zellen adsorbiert wurde. Bei fehlender Adsorption ist zum Virusnachweis in Vierkantflaschen eine Subpassage empfehlenswert. Diese Feststellung gilt nicht bei Verwendung von ESK-, ENS-Kulturen in Rouxschalen, hierbei wird bereits in der ersten Passage ein deutlicher ZPE erkennbar. Bei den Versuchen mit 5 KID₅₀ konnte nur in den ESK-Kulturen innerhalb von 24 Stunden p.i. eine Virusvermehrung beobachtet werden, in den ENS-Vierkantflaschen nach Adsorption innerhalb von 72 Stunden. Bei fehlender Adsorption war der ZPE weniger deutlich, in einem Fall mußte wiederum eine Subpassage eingeschaltet werden. Bei den in ENK-Vierkantflaschen durchgeführten Versuchen war sowohl bei Adsorption als auch bei Inokulation in das Medium eine Subpassage günstig. In Rouxschalen war bis auf einen Fall eine Virusvermehrung bereits in der Erstoppassage gegeben. Im Fall der Infektion mit 0.4 KID₅₀ konnte eine Virusvermehrung nur in einer Rouxschale mit ESK-Zellen, nicht aber in ENS-Vierkantflaschen und ENS-Rouxschalen ermittelt werden. Ein ZPE in den ENS-Kulturen war erst nach einer Subpassage in Rouxschalen zu erzielen.

Bei Inokulation von 1 sowie 0.5 KID₅₀ in Kulturröhren mit ENK- und ESK-Kulturen deuten die Ergebnisse (Tabelle 3) daraufhin, daß die Impfmenge von 0.5 KID₅₀ in ENK-Röhrenkulturen eine geringe-

Tabelle 2

Nachweis von 100, 10, 5 und 0,4 KID₅₀ des MKS-Virusstammes A₅-Westerwald auf verschiedenen Gewebekulturen (ENS, ENK, BHK und ESK)

Kulturart	Vierkantflaschen				Rouxschalen			
	mit Adsorption			ohne Adsorption	mit Adsorption			ohne Adsorption
Zelltyp	ENS	ENK	BHK	ESK	ENS	ENK	BHK	ESK
100 KID ₅₀	6/6	6/6	-	-	6/6	6/6	-	-
10 KID ₅₀	6/6	6/6	5/6+ ^x	-	6/6	3/6+ ^x 3	2/6+ ^x 4	-
5 KID ₅₀	6/6	3/6+ ^x 3	1/6	6/6	5/6+ ^x 1	2/6+ ^x 4	0/6	6/6
0,4 ALD ₅₀	0/6	0/6	0/6	0/4+ ^x 2	0/6	0/6	0/6	0/4
					1/13	0/8	-	0/4+ ^x 2
								0/14
								0/8
								-
								0/4+ ^x 1

Erläuterung: x = Positiv nach Subpassagen

- = nicht untersucht

re Infektiosität aufweist als eine solche von 1 KID₅₀. Weiter erkennt man unter Zugrundelegung der Ergebnisse eine statistisch signifikant höhere Empfindlichkeit der ESK- gegenüber den ENK-Kulturen auch bei der geringen Dosis von 0.5 KID₅₀. Unter der Voraussetzung, daß der ZPE als Maßstab der Virulenz gelten kann, haben sich ESK- und ENS-Kulturen empfindlicher als ENK- und BHK-Kulturen erwiesen. Aus den Versuchen ergibt sich außerdem eine höhere Virusvermehrungsrate in Rouxschalen als in Vierkantflaschen.

Tabelle 3

Nachweis von 1 und 0.5 KID₅₀ des MKS-Virus A₅-Westerwald auf ESK- und ENK-Kulturröhrchen

Impfdosis KID ₅₀	ENK <u>mit</u> Adsorption	ESK	ENK <u>ohne</u> Adsorption	ESK
1	9/15	12/15	9/15	11/15
0.5	6/15	12/15	6/15	10/15

Zähler = Röhrchen mit ZPE

4. Mittlerer Virustiter (DWK)

In der Tabelle 4 sind die arithmetischen Mittel der log KID₅₀-Werte für die verschiedenen Versuche aufgeführt. Die letzte Spalte enthält für jeden Virusstamm die Mittelwertdifferenz bezüglich der beiden Zellstämme. Der stärkste Empfänglichkeitsunterschied zwischen ESK- und ENS-Zellen zeigt sich beim Virus A₅-Westerwald, der schwächste bei O₂-Brescia. In allen Fällen ist der Empfänglichkeitsunterschied jedoch hoch signifikant, wie der zugehörige Standardfehler zeigt. Die Standardfehler lassen darüber hinaus erkennen, daß die Empfänglichkeitsunterschiede auch deutlich vom verwendeten Virustyp abhängen; zumindest ist die Differenz für A₅ (1.9774) signifikant größer als für G-Riems (1.294) und O₂ (1.0566).

Tabelle 4

Mittlerer Virustiter

Virus- Stamm	Herkunft	log KID ₅₀ (Mittelwert)		Mittelwertsdiffer. ESK - ENS
		ESK	ENS	
⁰ ₂ Brescia	7. Rd.Pass.	6.0830 (3) ⁺	5.0264	1.0566 ± 0.1445 ⁺⁺
^A ₅ Westerw.	26. ENS-Pass.	6.9417	4.9643	1.9774 ± 0.1127
^G Riems	5. ENS-Pass.	5.6990	4.4050	1.2940 ± 0.1397

+ = Anzahl Versuche aus denen der Mittelwert berechnet wurde

++ = Standardfehler der Mittelwertsdifferenz

5. Formalin-Inaktivierungsversuche

Die Inaktivierung des MKS-Virus 0₇-Italien (4. BHK-Passage) mit Formalinzusatz 1:4 000 bei pH 7.0 und 26° C geht in den ersten 24 Stunden rasch vor sich, nachfolgend schwächt sich die Inaktivierungsrate allmählich ab. Noch nach 264 Stunden Einwirkungszeit enthält das Virus-Formalingemisch infektiöses Restvirus, das in ESK- und ENS-Kulturen nachgewiesen werden kann. Diese Restinfektiosität beträgt 1.8 log KID₅₀/ml für ESK und 1.6 log KID₅₀/ml für ENS.

Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 5 und Abbildung 1 dargestellt. Aus der Abbildung 1 ist auch ersichtlich, daß die Inaktivierungskurve abweichend von einer Reaktion I. Ordnung verläuft.

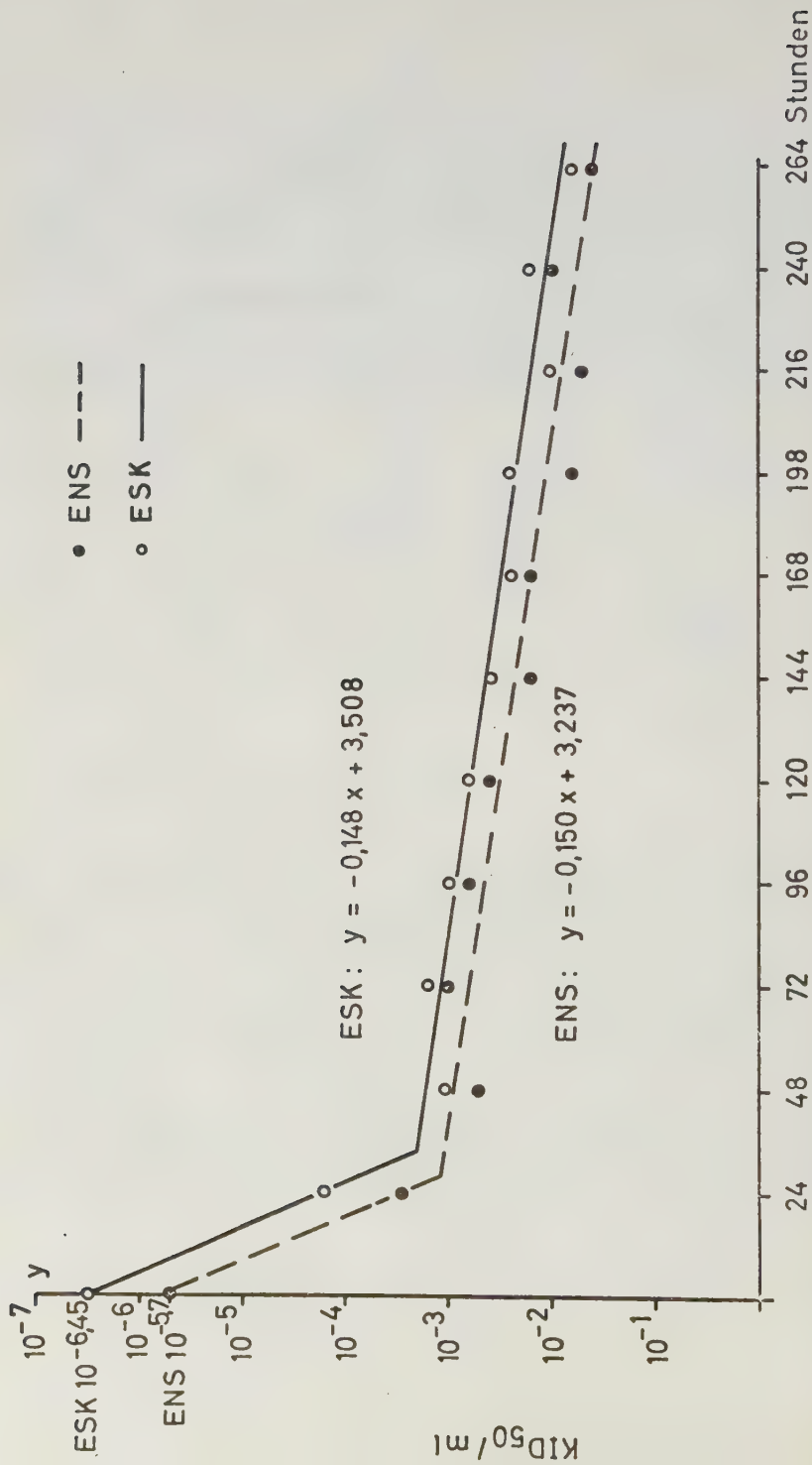
Tabelle 5

Inaktivierung des MKS-Virusstammes O₇-Italien (4. BHK-Pass.)
mit Formalin 1: 4 000 bei 26° C, pH 7.0

Stunden nach Formalin-Ein- wirkung	Titer KID ₅₀ /ml	
	ESK	ENS
0	6.45	5.7
24	4.2	3.45
48	3.0	2.7
72	3.2	3.0
96	3.0	2.8
120	2.8	2.6
144	2.6	2.2
168	2.4	2.2
192	2.4	1.8
216	2.0	1.7
240	2.2	2.0
264	1.8	1.6

Auch der Verlauf der Inaktivierung des MKS-Virusstammes O₁-Kaufbeuren (8. BHK-Passage) mit Formalinzusatz 1:2 000, wobei der pH-Wert mit Hilfe von Glykokoll-Puffer auf 8.0 eingestellt wurde, vollzieht sich bei einer Temperatur von 26° C am Anfang rasch. Der Verlauf der weiteren Inaktivierung hingegen verlangsamt sich. 192 Stunden nach Beginn der Inaktivierung war es nicht mehr möglich, infektiöses Virus in ENS-Kulturen nachzuweisen. Zum gleichen Zeitpunkt wurde in ESK-Kulturen eine Restinfektiosität von 1.45 log KID₅₀/ml festgestellt. Der Nachweis von Virus gelang in ESK-Kulturen bis zu 288 Stunden, danach war er stets negativ. Die Resultate von drei Versuchen sind in der Tabelle 6 und der Abbildung 2 wiedergegeben.

Aus der Tabelle 6 ist ersichtlich, daß Restinfektiosität in ENS nur bis zu einem Titer von 0.7 log KID₅₀/ml nachgewiesen werden



konnte, während die Nachweisbarkeit in ESK-Kulturen bei 0.35 log KID₅₀/ml lag.

Tabelle 6

Inaktivierung des MKS-Virusstammes O₁-Kaufbeuren (8. BHK-Pass.) mit Formalin 1:2 000 bei 26° C, pH 8.0

Stunden nach Formalin-Ein- wirkung	Titer KID ₅₀ /ml	
	ESK	ENS
0	7.45	7.2
24	4.7	4.45
48	3.95	3.7
72	3.45	2.95
96	2.45	1.95
120	1.95	1.7
144	1.7	0.95
168	1.45	0.7
192	1.45	---
216	1.2	---
240	0.95	---
264	0.7	---
288	0.35	---

Die Infektiositätstiter sowohl von formalininaktiviertem als auch von unbehandeltem MKS-Virus wurden in ENS- und ESK-Kulturen bestimmt. Mit den gleichen MKS-Virussuspensionen wurden je 10 vier Tage alte Babymäuse mit Dosen von 0.1 ml i.p. geimpft und danach der Zeitpunkt des Auftretens von Krankheitserscheinungen festgestellt. Die Mittelwerte von drei Kulturversuchen sind in Tabelle 7 dargestellt, die Ergebnisse der Mäuseversuche in Tabelle 8.

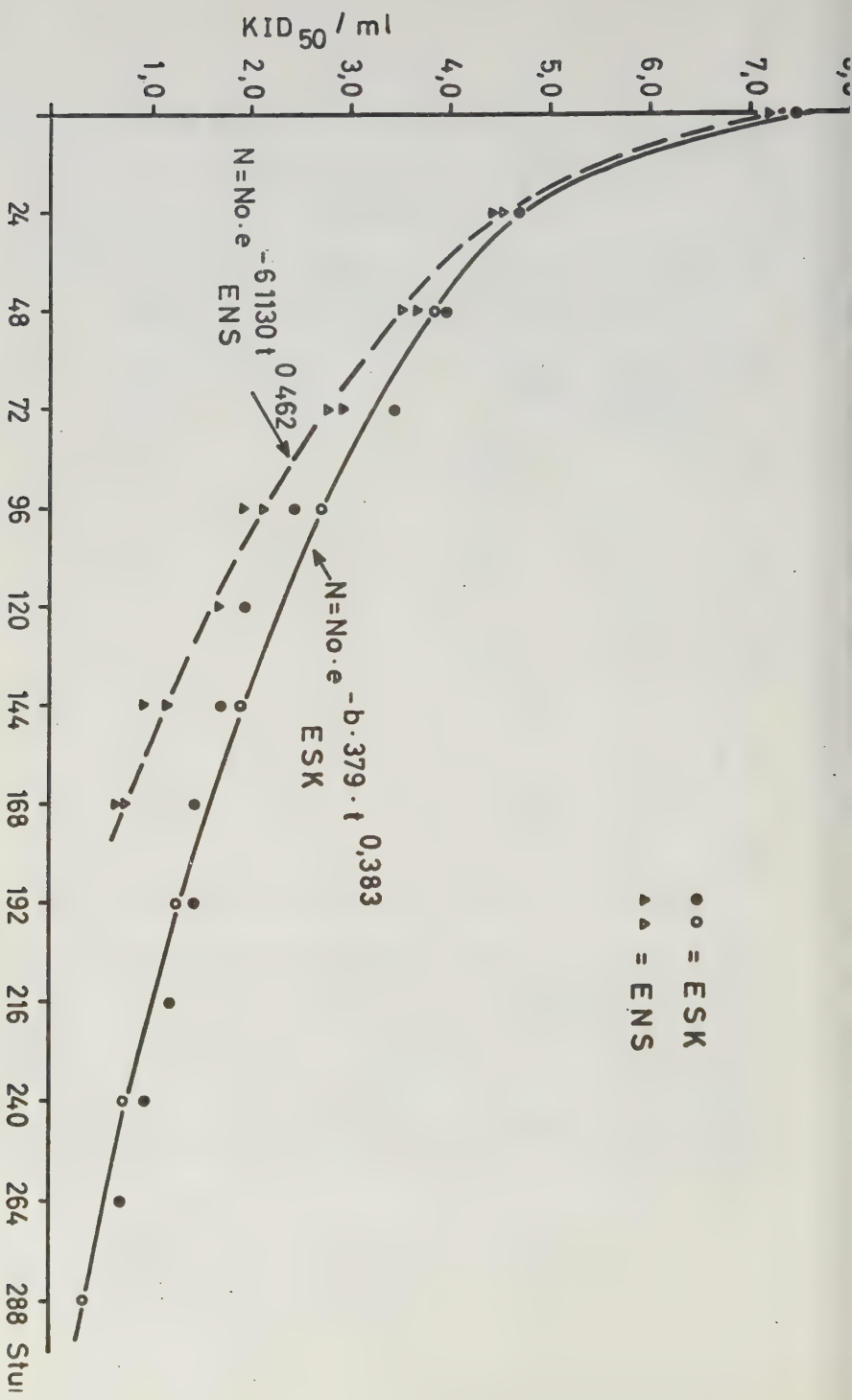


Tabelle 7

Titerentwicklung des MKS-Virusstammes O₁-Kaufbeuren (9. BHK-Pass.) ohne und mit Formalinzusatz 1:2 000 bei 26° C, pH 8.0, nach verschiedenen Einwirkungszeiten

Stunden nach Formalin-Ein- wirkung	Titer (log 10) KID ₅₀ am Tag nach Impfung					
	1. Versuch		2. Versuch		3. Versuch	
	ESK	ENS	ESK	ENS	ESK	ENS
0 (Unbeh.Virus)	7.1	6.2	7.5	7.1		
24	4.4	4.1	4.9	4.6		
48	2.8	2.1	3.8	3.3		
72	2.5	1.4	3.3	2.7		
96	1.3	—	2.6	2.0		2.3
120	0.4	—	2.1	1.7		1.8

Tabelle 8

Sterblichkeit und Erkrankung von Babymäusen nach Injektion von unbehandeltem und formalinbehandeltem MKS-Virus O₁-Kaufbeuren (9. BHK-Pass.)

Stunden nach Formalin-Ein- wirkung	Tage p.i.						
	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.
0 (Unbeh.Virus)	0	10 +					
24	0	1 +	8 +	1 +			
48					1 +		1 +
72						5 k	3 k
96						3 k	
120							

+ = gestorben, k = erkrankt und wieder genesen

Übereinstimmend ergibt sich aus den Gewebekultur- und den Tierversuchen, daß zwischen dem Zeitpunkt des Auftretens eines ZPE bzw. den Krankheitssymptomen und der Dauer der Formalineinwirkung eine positive Korrelation besteht. D.h. je länger die Formalin-inaktivierung dauert, um so später ist in den Gewebekulturen ein ZPE zu beobachten bzw. treten die Krankheitserscheinungen bei den infizierten Babymäusen zeitlich später auf. Die Titerdifferenz zwischen erster und letzter Ablesung in Gewebekulturen wird mit zunehmender Inaktivierungszeit des Virus größer.

Tabelle 9

Virusnachweis in Kulturröhrchen und Rouxschalen von ESK und ENS nach Inaktivierung des MKS-Virusstammes O₁-Kaufbeuren (8. BHK-Pass.) mit Formalin 1:2 000 bei 26° C, pH 8.0

Stunden nach Formalin-Ein- wirkung	Virusnachweis in:			
	Röhrchen		Rouxschalen	
	ESK	ENS	ESK	ENS
24	+	+	+	+
48	+	+	+	+
72	+	+	+	+
96	+	+	+	+
120	+	+	+	+
144	+	+	+	±
168	+	+	+	±
192	+	-	+	-
216	+	-	+	-
240	+	-	±	-
264	+	-	-	-
288	+	-	-	-
310	-	-	-	-

+ = positiver Nachweis, - = negativer Nachweis,

± = nur noch schwacher Nachweis

Wie aus Tabelle 9 hervorgeht konnte restaktives Virus in ENS- und ESK-Kulturen in Rouxschalen nach Verimpfung von 1.0 ml der inaktivierten Virussuspension in ENS-Kulturen bis 168 Stunden und in ESK-Kulturen bis 240 Stunden nach Formalineinwirkung ermittelt werden. Während in Röhrchenkulturen nach Beimpfung mit 0.2 ml pro Röhrchen der Nachweis in ESK-Kulturen bis 288 Stunden nach Beginn der Inaktivierung gelang; d.h. bei Verwendung von ESK-Kulturen ist mit der Röhrchen-Methode noch bei einem zwei Tage länger währenden Inaktivierungsprozeß restaktives Virus nachweisbar im Gegensatz zu den beimpften Rouxschalen.

Nach einer Lagerung der inaktivierten Suspension (Inaktivierung 312 Stunden bei 26° C) von 37 Tagen bei +4° C wurde der Nachweis von restaktivem Virus mit Stichproben von erhöhtem Volumen (5.0 ml pro Rouxschale) durchgeführt. Hierbei verlief der Virusnachweis positiv bei Verwendung von ESK; hingegen wurde auf ENS selbst nach Verimpfung von 25.0 ml pro Rouxschale kein positives Ergebnis erzielt.

6. Formalin-Inaktivierungsversuche von MKS-Adsorbatimpfstoffen

Wurde bei der Herstellung von Adsorbatimpfstoffen das Virus zuerst an $Al(OH)_3$ wie bei der industriellen Vakzineherstellung adsorbiert und danach Formalin 1: 2 000 zugesetzt, der pH-Wert auf 8.0 eingestellt und dieser Impfstoff bei 26° C inkubiert, so waren noch bis 24 Stunden nach Inaktivierungsbeginn restaktive Virusmengen in Mäusen nachweisbar. Virus auf diesem Wege noch nach 48-stündiger Inaktivierungszeit festzustellen mißlang. Hingegen war der Virusnachweis positiv, wenn der Adsorbatimpfstoff bis zu einer Formalineinwirkungszeit von 48 Stunden einer Elution unterworfen wurde. Die mit diesem Eluat infizierten Mäuse starben an den typischen Krankheitserscheinungen einer MKS-Infektion, beimpfte ENS-Kulturen zeigten einen spezifischen ZPE. Der Restvirusnachweis in Eluaten gelang in ESK-Kulturen bis zu 240 Stunden nach Beginn der Inaktivierung.

Wenn das in gleicher Weise - wie oben beschrieben - behandelte Virus ohne Formalinzusatz bei 26° C inkubiert wurde, konnte in-

fektiöses MKS-Virus in allen Testsystemen bis zu 240 Stunden nachgewiesen werden (Tabelle 10).

Tabelle 10

Virusnachweis in Mäusen aus MKS-Adsorbatimpfstoff mit und ohne Elution. MKS-Virusstamm O₁-Kaufbeuren (9. BHK-Pass.) mit Formalin 1:2 000 bei 26° C, pH 8.0

Stunden nach Formalin-Ein- wirkungszeit	Vakzine <u>ohne</u> Formalin		Vakzine <u>mit</u> Formalin	
	Gesamt- impfstoff	Eluat	Gesamt- impfstoff	Eluat
24	10/10	10/10	10/10	10/10
48	10/10	10/10	0/10	1/10
120	10/10	10/10	0/10	0/10
240	2/10	4/10	0/10	0/10

Zähler $\neq$ an MKS spezifisch erkrankte Mäuse

Virusnachweis in Gewebekulturen aus MKS-Adsorbatimpfstoffen nach Elution. MKS-Virusstamm wie zuvor.

Stunden nach Formalin-Ein- wirkungszeit	Eluat von Vakzine <u>ohne</u> Formalin		Eluat von Vakzine <u>mit</u> Formalin	
	ESK	ENS	ESK	ENS
24	4/4	4/4	20/20	20/20
48	5/5	5/5	12/20	1/20
120	5/5	4/5	4/20	0/20
240	7/8	2/8	1/30	0/30

Zähler = positive Kulturen mit ZPE

7. Vakzineprüfung

Bei der Untersuchung von sieben mono- und trivalenten Handels-MKS-Vakzinen verschiedener Hersteller und verschiedener Herstellungsdaten konnte infektiöses Virus zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Herstellung (3 bis 18 Monate) in Gewebekulturen (ENS und ESK) nie mit einem typischen, für MKS sprechenden, ZPE nachgewiesen werden.

Es wurde aber beobachtet, daß bei drei Vakzinen in ESK-Kulturen eine Zellalteration auftrat, die zunächst als geringgradiger MKS-Virus spezifischer ZPE gedeutet wurde. Durch vier aufeinanderfolgende Subpassagen sowohl in ENS als auch in ESK-Kulturen konnten diese Veränderungen aber nicht verstärkt werden und die Verimpfung dieses Materials auf Mäuse führte bei diesen Tieren nicht zu einer Erkrankung an MKS.

E. Besprechung der Ergebnisse

Während der ersten Anzuchtpassagen von MKS-Virus der Typen O und C in ENS-Gewebekulturen traten keine Schwierigkeiten bei der Adaptation des Virus auf. Diese beiden Typen, insbesondere der Stamm O₂ vermehrten sich gut von der ersten Passage an. Hingegen mußten beim Stamm A₅ Verzögerungen bei der Adaptation überwunden werden, deren Ursache möglicherweise auf einem Verlust der Infektiosität bei der längeren Lagerung beruhen. Diese Schwierigkeiten wurden auch von Dinter (1958) und Mayr und Wittmann (1960) beschrieben. Dinter vermutet auf Grund seiner experimentellen Ergebnisse das Vorhandensein von zwei infektiösen Viruspartikeln bei den gering zytopathogenen MKS-Stämmen, wovon nur das eine für Nierenkulturen infektiös ist. Die vollständige Zellzerstörung könnte dann als Interferenz zwischen den zytopathogenen und azytopathogenen Partikeln gedeutet werden.

Die Verwendung von Aktinomycin D führt nicht zu einer besseren Adaptation. Dagegen konnte mit höheren Animpfdosen ein stärkerer ZPE induziert werden. Das wiederum bedeutet, daß die Menge der vorhandenen zytopathogenen Viruspartikel eine wichtige Rolle bei Auftreten eines ZPE spielt.

Es wäre denkbar, daß bei höheren Infektionsdosen mehr Zellen mit zytopathogenen Partikeln infiziert werden und demzufolge ein ZPE früher in Erscheinung tritt. Bei geringeren Infektionsdosen könnten Interferenzerscheinungen während der langsamen Infektiositätsausbreitung das Auftreten eines ausgeprägten ZPE verhindern.

Die heute gebräuchlichen MKS-Vakzinen werden aus Gewebekultur-virussuspensionen hergestellt. Hierbei wird vornehmlich mit BHK₂₁- oder Ferkelnierenzellkulturen gearbeitet, in einigen Fällen wird auch Rinderzungenepithel benutzt, so z.B. bei der Frenkel-Methode. Für die Herstellung dieser Vakzinen ist es von entscheidender Bedeutung, gut an diese Kulturen adaptierte MKS-Virusstämme zu benutzen, da die Titerhöhe des Impfstoffstammes ausschlaggebend für die immunisierende Wirkung ist.

Untersuchungen von Graves (1963) und Mayr (1962) zeigten, daß

zur Erhaltung der vollen Antigenität des zur Impfstoffherstellung benutzten Virusstammes nur wenige Passagen in den zur Herstellung benutzten Gewebekultursystemen durchgeführt werden dürfen. Mit diesen wenigen Passagen kann die Virusausbeute so gesteigert werden, daß ein befriedigend hoher Virustiter für die Impfstoffproduktion erreicht wird.

Um in inaktivierten MKS-Impfstoffen evtl. noch vorhandenes Restvirus nachweisen zu können, war es erforderlich, ein möglichst empfindliches Gewebekultursystem zu finden. Es wurden daher Kälberschilddrüsen- und Schweinenierenzellkulturen auf ihre Eignung zur Titration von ENS-adaptierten MKS-Virusstämmen geprüft. Dabei zeigte sich, daß bei niedrig passagiertem Virus die ESK-Kulturen empfindlicher als die ENS-Kulturen waren (Tabelle 1). Es kann daraus geschlossen werden, daß im Rahmen der Unschädlichkeitsprüfung von MKS-Vakzinen ESK-Kulturen als geeignetes Testsystem zum Nachweis von evtl. vorhandenem Restvirus verwendet werden können. Diese Befunde stimmen mit denen von Snowdon (1966) überein, der aber mit nicht modifiziertem Rindervirus arbeitete.

Aus den Ergebnissen war weiterhin ersichtlich, daß sich restaktives MKS-Virus aus formalinbehandelten Virussuspensionen in einer Eigenschaft von unbehandeltem Virus unterscheidet. Es wurde festgestellt, daß dieses restaktive Virus eine verlängerte Inkubationszeit bis zum Auftreten eines ZPE in Gewebekulturen und bis zum klinisch erkennbaren Beginn der Erkrankung im Mäuseversuch benötigt. Diese verlängerte Inkubationszeit ist proportional der Formalininaktivierungszeit und abhängig vom verwendeten Zelltyp.

Sellers (1960) benutzte verschiedene MKS-Stämme und konnte zeigen, daß bis zum Auftreten eines ZPE in ENS-Zellen 18 bis 24 Stunden vergehen. Snowdon (1966) fand in ESK einen frühzeitig auftretenden ZPE zwischen 6 und 10 Stunden nach der Beimpfung, der nach 24 Stunden sein Maximum erreichte.

Ein Verzögerungseffekt bei der Auslösung der Infektion wurde auch bei formalinbehandeltem Polio-Virus von Timm u.a. (1956), Gard und Lycke (1957), Taylor u.a. (1957) und von Böttiger u.a. (1958) festgestellt. Es wird vermutet, daß diese Verzögerung im Auftreten der

Infektion bei der MKS in einer graduell verminderten Adsorptionsrate besteht.

Die eigenen Versuchsergebnisse lassen erkennen, daß ESK-Kulturen zum Nachweis von restaktivem Virus aus MKS-Vakzinen gut geeignet sind, weil das Virus in diesen Kulturen frühzeitiger als in anderen nachweisbar ist. In diesem Zusammenhang stellten Brown u.a. (1963) fest, daß bei intradermolingualer Injektion von formalin-behandeltem Virus das Auftreten von MKS-Aphthen bis zu fünf Tagen verzögert ist, während unbehandeltes Virus innerhalb von 24 bis 48 Stunden bei Rindern Aphthen hervorruft.

Diese Resultate stimmen mit unseren Befunden an Mäusen überein. Dagegen konnte restaktives Virus in ESK innerhalb von 24 Stunden, in ENS in 48 Stunden nachgewiesen werden.

Aus den Untersuchungen von Schneider (1955) geht hervor, daß Rinder bereits 102 bis 120 Stunden post vaccinationem, nach Wisniewski (1965) zwischen dem 3. und 7. Tag p.v. MKS-Antikörper bilden. Der Nachweis von restaktivem Virus wird dadurch erschwert. Die Vermutung von Schneider (1955), daß 4 bis 5 Tage alte Baby-mäuse nicht zur Bildung von MKS-Antikörpern befähigt sind, konnte Mahnel (1963) auf Grund experimenteller Nachprüfung widerlegen; drei Tage nach der Impfung mit einer Formalin-Vakzine war bei infantilen Mäusen bereits eine MKS-spezifische Immunität gegenüber kleinen Infektionsdosen vorhanden. Das bedeutet, daß die erste Überlegung von Schneider richtig ist, wonach Vakzinen restaktives Virus in Mengen enthalten können die für Mäuse, nicht aber für Rinder infektiös sind.

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse von Schneider und Mahnel sowie der Tatsache, daß nach Applikation von formalininaktiviertem MKS-Virus bei Rindern (Brown u.a., 1963) und Mäusen (eigene Beobachtungen) mit verlängerten Inkubationszeiten gerechnet werden muß, wird die Eignung von Rindern und Mäusen zum Nachweis von restaktivem Virus aus MKS-Vakzinen weitgehend eingeschränkt.

Wesslen und Dinter (1957), sowie Graves (1963) und Bachrach (1957) stellten unter Verwendung von ENK-Kulturen für das MKS-Virus Formalin-Inaktivierungskurven auf. Sellers (1960) verwendete in

seinen Versuchen Säuglingsmäuse, während Brown u.a. (1963) mit Hilfe von Rindern und Mäusen den Infektiositätsabfall von mit Formalin inaktivierten MKS-Virussuspensionen bestimmten.

Aus allen diesen Versuchen geht deutlich hervor, daß die Formalin-inaktivierung des MKS-Virus eindeutig von einer Reaktion I. Ordnung abweicht, wie sie im übrigen auch von Gard (1957) für die Formalininaktivierung des Polio-Virus gefunden wurde.

Nach einem Vergleich der Formalininaktivierungsprozesse von MKS- und Polio-Virus kamen Wesslen und Dinter (1957) zu dem Schluß, daß die Formalininaktivierung von MKS-Virus schneller als die von Polio-Virus verläuft. Verwendet man aber an Stelle der von Wesslen und Dinter benutzten Kälbernierenzellkulturen Schweinenieren- und Kälberschilddrüsenzellkulturen, so ergeben sich Ähnlichkeiten im Inaktivierungsverlauf von Polio- und MKS-Virus. Diese Befunde weisen darauf hin, daß das Testsystem bei der Verfolgung der Inaktivierungsprozesse eine entscheidende Rolle spielt. Für die eigenen Versuche zur Aufklärung des Formalininaktivierungsprozesses für das MKS-Virus wurden ESK- und ENS-Kulturen verwendet. Voraussetzung für die Ermittlung der Inaktivierungskurven ist die Kenntnis der Inaktivierungs-Kinetik. Sie ist besonders dann unerlässlich, wenn ein direkter Nachweis einer evtl. vorhandenen Restaktivität praktisch unmöglich ist. In einem solchen Fall ist man gezwungen, aus der Art der Aktivitätsabnahme an solchen Zeitpunkten, wo ein direkter Nachweis möglich ist, auf die Aktivität an späteren Zeitpunkten zu schließen. Es handelt sich um das Problem der Extrapolation.

Die Güte einer Extrapolation hängt von zwei Faktoren ab: 1. von der Wahl der eigenen Funktion (predictor), mit deren Hilfe die Extrapolation erfolgen soll; 2. von der Meßgenauigkeit derjenigen Beobachtungen, an welchen die Extrapolationsfunktion angepaßt werden soll.

Im einfachsten Fall einer Reaktion I. Ordnung würde es sich um eine lineare Extrapolation handeln. Aus allen hier durchgeführten Versuchen geht jedoch hervor, daß die Formalin-Inaktivierung des MKS-Virus in keinem Falle einer Reaktion erster Ordnung folgt.

Dies steht in Übereinstimmung mit allen in der Literatur berichteten Erfahrungen. Allerdings besteht keine einheitliche Meinung darüber, durch welchen Kurventyp der charakteristische Inaktivierungsverlauf von MKS-Viren am besten beschrieben wird. Die Bedeutung dieser Frage wurde oben geschildert; ihr wird jedoch durch eine nur nach Augenmaß und mit freier Hand gezeichneten Ausgleichskurve nicht Genüge getan, weil damit das Problem der Extrapolation unbefriedigend gelöst wird. Die Frage läßt sich nur durch Verwendung einer geeigneten mathematischen Funktion beantworten, die aus einem biologischen Reaktionsmodell abgeleitet wird. Je nach dem zugrundegelegten Modell ergibt sich eine andere Gleichung für den Inaktivierungsverlauf. Man wird demjenigen Modell den Vorzug geben, dessen Gleichung in besserer Übereinstimmung mit den beobachteten Daten steht. Die Entscheidung zwischen verschiedenen Modellen ist allerdings nicht immer einfach, da die unvermeidlichen Meßungenauigkeiten (hier: Ungenauigkeiten der Titerbestimmung) oft dazu führen, daß die fehlerhaften Daten mit beiden Modellen gleich gut (oder gleich schlecht) vereinbar erscheinen. Die Konsequenz einer falschen Wahl besteht darin, daß die konkurrierenden Funktionen zwar im Bereich der beobachteten Werte nicht sehr voneinander abweichen, jedoch zu stark divergierenden Extrapolationen führen können.

Aus der Literatur sind im wesentlichen zwei Modelle für die Virusinaktivierung mit ihren zugehörigen Gleichungen bekannt. Das ältere stammt von Gard u.a. (1957) und baut auf der Hypothese einer Gerbung der Proteinhülle auf. Demgegenüber steht ein Modell (siehe Hiatt, 1964), welches auf der Superposition zweier gegeneinander verlaufenden Reaktionen I. Ordnung beruht und das zu der häufig beobachteten Knickkurve mit zwei geradlinigen Komponenten führt (steile Komponente am Anfang, dann flache Komponente). Das Gard'sche Modell ist von Döhner (1965) weiterentwickelt worden und läßt sich auch mathematisch einfacher handhaben als die ursprüngliche Version von Gard.

In den vorliegenden Experimenten stellte sich heraus, daß sich bei Varilierung der Versuchsbedingungen unterschiedliche Kurventypen ergeben. Bei einer Formalinkonzentration von 1: 2000 und

pH 8.0 entsprach der Resttiterverlauf deutlich dem GARD-DÖHNER-Typ, bei Formalin 1: 4000 und pH 7.0 jedoch dem Zweikomponententyp. Die Inkubationstemperatur betrug in beiden Fällen 26°C .

Die GARD-DÖHNER-Gleichung lautet:

$$\frac{N_0}{N} = e^{\frac{K}{b} t^b} \quad (1)$$

Hier bedeutet:

N_0 die Anzahl aktiver Partikel zur Zeit 0 (ohne Formalin),

N die Anzahl aktiver Partikel zur Zeit t ,

K und b sind zwei Konstanten, durch die der Verlauf der Resttiterkurve eindeutig festgelegt wird. Durch zweimaliges Logarithmieren erhält man aus (1)

$$\log \log \frac{N_0}{N} = \log \frac{K}{2.303 \cdot b} + b \log t \quad (2)$$

Wählt man daher $x = \log t$ als Abzisse und $y = \log \log \frac{N_0}{N}$ als Ordinate und setzt zur Abkürzung noch $a = \log \frac{K}{2.303 \cdot b}$ so erhält man eine gradlinige Beziehung.

$$y = a + b \cdot x.$$

Inaktivierungsverläufe, die vom GARD-DÖHNER-Typ abweichen, ergeben in diesem Koordinatensystem keine gerade Linie! Man kann auf diese Weise einfach erkennen, welcher Kurventyp vorliegt.

Die Konstanten a und b werden nunmehr nach der Methode der kleinsten Quadrate bestimmt. Aus a erhält man schließlich durch Umformung noch die Konstante K , denn es ist

$$a = \log \frac{K}{2.303 \cdot b} = \log K - \log 2.303 - \log b$$

also

$$\log K = a + \log 2.303 + \log b.$$

Die geometrische Darstellung von Inaktivierungskurven erfolgt gewöhnlich in einem Koordinatensystem mit t als Abzisse und $\log \frac{N_0}{N}$ als Ordinate. Aus (2) erhält man für beliebige Zeitpunkte t durch einmaliges Entlogarithmieren die zugehörigen Werte $\log \frac{N_0}{N}$. Das

Ergebnis für 1: 2000 Formalin und pH 8.0 ist in Abbildung 2 dargestellt. Der Nachweis des GARD-DÖHNER-Typs ergibt sich aus der linearen Beziehung in dieser Abbildung.

Für die Inaktivierung mit Formalin 1: 4000 und pH 7.0 ist $\log \log \frac{N_0}{N}$ nicht linear in Bezug auf $\log t$ (Abbildung 1). Daher wurde hierfür eine Zweikomponenteninaktivierung angenommen. Die Berechnung erfolgte ebenfalls nach der Methode der kleinsten Quadrate. Dabei wurde für jeden der beiden Ä_{St}e im $(t, \log \frac{N_0}{N})$ -System eine eigene lineare Ausgleichsgerade berechnet.

In beiden Fällen läßt sich erkennen, daß die auf ESK-Kulturen nachgewiesenen Resttiter höher sind als auf ENS-Kulturen. Bei der GARD-DÖHNER-Inaktivierung divergieren die beiden Resttiterkurven mit wachsender Zeit zunehmend. Dieser Versuch konnte in zwei weiteren Experimenten reproduziert werden. Demgegenüber scheinen die zweikomponentigen Resttiterkurven lediglich durch eine Parallelverschiebung gegeneinander versetzt zu sein. Wie schon an anderer Stelle erwähnt, kann mit ESK-Kulturen ein empfindlicherer Nachweis von restaktivem Virus geführt werden.

Bei der Verwendung von Gewebekulturen im Rahmen von Untersuchungen zur Inaktivierung des MKS-Virus (Formalinkonzentration 1: 2000 pH 8.0, 26° C) zeigte sich, daß restaktives MKS-Virus in ESK bis zu 288 Stunden p.i., in ENS-Kulturen nur bis zu 168 Stunden nachweisbar ist. Brown (1963) prüfte den Abfall der Infektiosität einer MKS-Virussuspension nach Formalin-Inaktivierung (Formalinkonzentration 1: 2000, pH 7.6 und 8.7, 26° C) durch intraperitoneale Infektion von Babymäusen und intradermolinguale Infektion von Rindern und fand, daß mit letzterem Verfahren bis zu 144 Stunden p.i., bei ersterem bis zu 72 Stunden (pH 7.6) bzw. 48 Stunden (pH 8.7) restaktives Virus ermittelt werden konnte. Graves (1963) konnte bis zu 192 Stunden p.i. (Formalinkonzentration 1: 2000, 37° C) in Rindern restaktives Virus nachweisen. Wesslen und Dinter (1957) fanden in analogen Versuchen nach Formalininaktivierung infektiöses MKS-Virus in ENK-Kulturen bis zu 60 Stunden post inaktivierungem (Formalinkonzentration 1: 2000, pH 9.0, 25° C) bzw. 48 bis 72 Stunden (Formalinkonzentration 1: 2000, pH 7.0, 25° C). Aus einem Vergleich der Ergebnisse von Wesslen und Dinter sowie

der in vorliegender Arbeit beschriebenen Ergebnisse ergibt sich, daß ESK und ENS empfindlicher für den Nachweis von restaktivem Virus sind als ENK.

Auf Grund seiner Inaktivierungsergebnisse hatte Grave (1963) berechnet, daß eine MKS-Virussuspension mit einem Ausgangstitel von $10^{7.0}$ ID₅₀ nach einer Inaktivierungszeit von 11 Tagen (Formalin-konzentration 1: 1000, 22° C) noch restaktives Virus in Mengen von 1 ID₅₀/Liter enthalten kann.

Aus unseren Ergebnissen geht hervor, daß nach einer Formalinin-aktivierungszeit von 12 Tagen (Formalinkonzentration 1: 2000, 26° C) in ESK noch eine Restaktivität von 2 KID₅₀/ml enthalten war.

Wesslen und Dinter (1957) kommen nach Vergleichen ihrer Befunde mit den Ergebnissen der MKS-Vakzineproduktion zu dem Schluß, daß nach Ablauf einer Inaktivierungszeit von 24 Stunden, wie das normalerweise bei der handelsüblichen Vakzineproduktion geschieht, aber ohne daß Al(OH)₃ als Adsorbens verwendet wurde, auf ENK-Kulturen noch 1 000 ID₅₀/ml enthalten sind. Dieser Wert liegt für ESK-Kulturen bei 50 000 KID₅₀/ml, für ENS-Kulturen bei 28 000 KID₅₀/ml. Mithin sind die ESK-Kulturen um ca. 50% empfindlicher als die ENK-Kulturen.

Im Gegensatz zu den Tierversuchen bei Rind und Maus kann der Nachweis von restaktivem MKS-Virus aus Adsorbatvakzinen auf Gewebekulturen erst nach Elution des Virus vom Adsorbens geführt werden.

Seller (1960) prüfte durch intraperitoneale Infektion von Baby-mäusen den Infektionsitätsverlust von MKS-Virus nach Formalin-Inaktivierung in Gegenwart von Aluminiumhydroxyd. Die MKS-Vakzine war nur bis zu 24 Stunden p.i. für Mäuse infektiös. Diese Ergebnisse konnten in unseren Versuchen bestätigt werden. Wurde das Virus von Al(OH)₃ aber eluiert, so erkrankte von zehn Mäusen nur ein Tier, das mit 48 Stunden inaktiviertem Material infiziert worden war. Diese Feststellung kann damit begründet werden, daß bei der Verimpfung von Vakzine das restaktive MKS-Virus nur langsam von Aluminiumhydroxyd eluiert wird und deshalb wegen einsetzender Antikörperbildung zu keiner Erkrankung führt. Aus diesen Befunden

ergeben sich auch Schlußfolgerungen über die Bedeutung des Aluminiumhydroxyds für die Unschädlichkeitsprüfung am Rind.

Bei der Prüfung solcher Vakzinen konnte nach Elution auf ESK-Kulturen restaktives Virus bis zu 240 Stunden post inactivationem nachgewiesen werden, hingegen war der Nachweis in ENS-Kulturen im Vakzineeluat nur bis zu 48 Stunden post inactivationem möglich. Auch in diesem Falle erwiesen sich die ESK-Kulturen als empfindlicher.

Sollen MKS-Handelsvakzinen auf Freisein von aktivem MKS-Virus in Gewebekulturen geprüft werden, so ist eine Elution des Virus vom $\text{Al}(\text{OH})_3$ durchzuführen.

Abschließend kann somit festgestellt werden, daß Zellkulturen für den Nachweis von restaktivem MKS-Virus hoch empfindlich sind, wobei die sichersten Resultate bei Verwendung von ESK-Kulturen erwartet werden können. Da aber bei der Herstellung des MKS-Impfstoffes auf industrieller Basis die Virusinaktivierung, die in einem Zeitraum von nur 30 bis 48 Stunden erfolgt, im Beisein von $\text{Al}(\text{OH})_3$ stattfindet, ist eine direkte Prüfung der inaktivierten Virussuspension auf Zellkulturen mit einem entsprechend hohen Stichprobenvolumen wie z.B. beim Poliomyelitis-Impfstoff nicht möglich. Einer solchen Unschädlichkeitsprüfung müßte in jedem Falle die Elution vorangehen, ein Vorgang, der die Prüfung erheblich kompliziert.

Wenn sich bisher auch keine Anhaltspunkte ergeben haben, daß die für die Anwendung in der Praxis nach Bestehen der Unschädlichkeitsprüfung am Rind freigegebenen MKS-Impfstoffe noch restaktives MKS-Virus in Mengen enthalten, die so gering sind, daß sie sich den bisherigen Nachweismethoden infolge zu geringen Stichprobenvolumens entziehen, so sollte das Problem doch nicht vernachlässigt werden und wenigstens ab und zu eine größere Stichprobe eines Handelsimpfstoffes nach Elution auf den im Rahmen der vorstehenden Untersuchungen als besonders empfindlich erkannten ESK-Zellkulturen geprüft werden.

F. Zusammenfassung

Kälberschilddrüsen- (ESK) und Schweinenierenzellkulturen (ENS) wurden auf ihre Eignung zur Titration von ENS-adaptierten MKS-Virusstämmen geprüft. ESK-Kulturen erwiesen sich als wesentlich empfindlicher und wurden daher als geeignetes Testsystem zum Nachweis von "restaktivem" Virus in Impfstoffen als geeignet befunden.

Die Formalininaktivierung des MKS-Virus wurde bei einer Formalinkonzentration von 1: 2000, pH 8.0, 26° C untersucht. Es wurde festgestellt, daß mit Hilfe von ESK-Kulturen "restaktives" Virus bis 288 Stunden post inactivationem nachgewiesen werden konnte, hingegen gelang der Nachweis in ENS-Kulturen nur bis zu 168 Stunden nach Beginn der Formalininaktivierung. Aus diesen Ergebnissen geht hervor, daß nach einer Formalininaktivierungszeit von 12 Tagen in ESK noch eine Restaktivität von 2 KID₅₀/ml nachgewiesen werden kann.

Zum Nachweis von aktivem MKS-Virus aus Handelsvakzinen in Gewebekulturen ist eine Elution des Virus vom Aluminiumhydroxyd erforderlich. Auch bei diesen Versuchen erwiesen sich Kälberschilddrüsenkulturen am empfindlichsten.

G. Literaturverzeichnis

1. Arlinghaus, R.B.; H.L.Bachrach and J. Polatnick (1968)
Site of foot-and-mouth disease virus ribonucleic acid
synthesis and some properties of its double-stranded
ribonucleic acid.
Biochem. Biophys. Acta. 161, 170.
2. Bachrach, H.L. (1966)
Reactivity of viruses in vitro.
Progress in medical virology, 8, 214.
3. Bachrach, H.L. (1967)
FAO Technical Meeting
A review: Structure of foot-and-mouth disease virus deduced
from its chemical and physical properties.
4. Bachrach, H.L.; W.R.Hess; J.J.Callis (1955)
Foot-and-mouth disease virus: Its growth and cytopath-
ogenicity in tissue culture.
Science 122, 1269.
5. Bachrach, H.L.; S.S.Breese, Jun; W.R.Hess and R.E.Patty (1957)
Inactivation of foot-and-mouth disease virus by PH and
temperature changes and by formaldehyde.
Proc. Soc. exper. Biol. Med. 95, 147.
6. Bachrach, H.L.; S.S.Breese, JR. (1958)
Purification and electron microscopy of foot-and-mouth
virus.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 97, 659.
7. Bachrach, H.L. and J. Polatnick (1967)
Amino acid composition of three immunological types of
foot-and-mouth disease virus.
Proc. Soc. exp. Biol. 124, 465.
8. Böttiger, M.; E.Lycke; B.Melén and G.Wrange (1958)
Inactivation of Poliomyelitis virus by formaldehyde.
Arch. ges. Virusforsch. 8, 259.
9. Brooksby, J.B. and E.Wardle (1954)
Titration of foot-and-mouth disease virus in culture.
J. Hyg. (Camb.) 52, 87.
10. Brown, F.; N.St G.Hyslop; J.Crick and A.W.Morrow (1963)
The use of acetyleneimine in the production of
inactivated foot-and-mouth disease virus.
J. Hyg. (Camb.) 61, 337.
11. Cavalli-sforza, L.L. (1964)
Grundbegriffe der Biometrie.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
12. Cottral, G.E.; R.E.Patty; P.Gaillunas and F.W.Scott (1965)
Sensitivity of cell cultures, cattle, mice and guinea
pigs for detection of nineteen foot-and-mouth disease
Viruses.
Bull. Off. Int. Epiz. 63, 1607.

13. Cowan, K.M. and J.H.Graves (1966)
A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection.
Virology 30, 528.
14. Dinter, Z. (1958)
Interferenz zwischen cytopathogenen und nicht-cytopathogenen Partikeln des Virus der Maul-und Klauenseuche (MKS).
Arch. ges. Virusforsch. 8, 42.
15. Döhner, L. (1965)
Ein Beitrag zur Formulierung der Formalininaktivierung von Poliomyelitis Virus.
Arch. ges. Virusforsch. 17, 251.
16. Dulbecco, R. (1952)
Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus.
Proc. nat. Acad. Sci. 38, 747.
17. Dulbecco, R. and M.Vogt (1954)
Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses.
J. Exp. Med. 99, 167.
18. Earle, W.R. (1943)
Production of malignancy in vitro. IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells.
J. Nat. Cancer Inst. 4, 165.
19. Eißner, G.; H.O.Böhm und E.Jülich (1967)
Ein Maul-und Klauenseuche-infektion beim Menschen.
Dtsch. med. Wschr. 92, 830.
20. Frenkel, H.S. (1947)
La culture du virus de la fièvre aphteuse sur l'épithélium de la langue des bovidés.
Bull. Off. int. Epiz. 28, 155.
21. Gard, S. (1957)
Giba foundation symposium on the nature of viruses.
Churchill, London, S. 123.
22. Gard, S. and E.Lycke (1957)
Inactivation of poliovirus by formaldehyde, Analysis of inactivation curve.
Arch. ges. Virusforsch. 7, 471.
23. Girard, H. und C.Mackowiak (1949)
Le vaccin antiaphteus du type Schmid-Vallée-Waldmann est un Vaccine vivant inactivé.
Bull. l'Acad. Vét. 22, 285.

24. Graves, J.H. (1963)
Formaldehyde inactivation of foot-and-mouth disease virus as applied to vaccine preparation.
Am. J. Vet. Med. 24, 1131.
25. Graves, J.H. (1963)
Foot-and-mouth disease vaccine: The production of antigen in cultured cells in the absence of serum.
Am. J. Vet. Res. 24, 183.
26. Graves, J.H.; K.M. Cowan and R. Trautman (1968)
Immunochemical studies of foot-and-mouth disease.
II. Characterization of RNA-free viruslike particles.
Virology 34, 269.
27. Hanks, J.H. and R.E. Wallace (1949)
Relation of oxygen and temperature in the preservation of tissues by refrigeration.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 71, 196.
28. Hecke, F. (1930)
Züchtungsversuche des Maul-und Klauenseuche-virus in Gewebekulturen.
Zbl. Bakt. 1 Orig. 116, 386.
29. Hiatt, C.W. (1964)
Kinetics of the inactivation of viruses.
Bact. Review 28, 150
30. International Enterovirus Study Group (1963)
Picornavirus Group.
Virology 19, 114.
31. Jamison, R.M. and H.D. Mayor (1966)
Comparative study of seven picornavirus of man.
J. Bacteriol. 92, 1521.
32. Kärber, G. (1931)
Naunyn-Schmiedeberg's
Arch. exp. Path. Pharmac. 162, 480.
33. Kobusiewicz, T. and J. Wislowski (1965)
Titration of foot-and-mouth disease virus in vivo and in pig kidney cell cultures.
Medycyna Wet. 21, 16.
34. Kuwert, E. and T.N. Hoang (1959)
Vergleichende Titration des Maul-und Klauenseuche-Virus vom Typ O in der Gewebekultur und an der Rinderzunge.
Arch. Exp. Veterinaarmed. 13, 293.
35. Loeffler, F. und P. Frosch (1997-8)
Summarischer Bericht über die Ergebnisse der Untersuchungen der Kommission zur Erforschung der Maul-und Klauenseuche.
Zbl. Bakt. 1. Orig. 22, 257 and 23, 371

36. Mackowiak, C. und R.Lang (1958)
Emploi des cultures de tissu dans le titrage du virus aphteux et la recherche des anticorps.
Bull. Off. int. Epiz. 49, 99.
37. Mahnel, H. (1963)
Wirksamkeit von formalinaktiviertem Maul-und Klauenseuchevirus bei der infantilen Maus.
Zbl. Veter. Med. B. 10, 102.
38. Maitland, M.C. and H.B.Maitland (1931)
Cultivation of foot-and-mouth disease virus.
J. Comp. Pathol. 44, 106.
39. Matheka, H.D. (1959)
Über das Verhalten des Maul-und Klauenseuche Virus bei A Adsorption an Aluminiumhydroxyd und nachfolgender Elution
1. Mitteilung: Untersuchung der Faktoren, die die Adsorption und Elution beeinflussen.
Zbl. Bakt. 1. Orig. 174, 473.
40. Mayr, A. (1962)
Immunität, Immunisierung und Impfstoffe bei der Maul- und Klauenseuche.
Monographie 1962, Tübingen, Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere.
41. Mayr, A. und W.Schwöbel (1956)
Züchtung des Virus der ansteckenden Schweinelämung in der Gewebekultur.
Mh. Tierheilk. 8, 49.
42. Mayr, A. und G.Wittmann (1960)
Virusdauerpassage in Zellkulturen als modifizierende Faktor für die Entwicklung einer Lebendvakzine gegen die Maul- und Klauenseuche.
Zbl. Vet. Med. 7, 829.
43. Mc Gregor, S.; C.A.Phillips and H.D.Mayor (1966)
Purification and biophysical properties of rhinoviruses.
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 122, 118.
44. Merettig, O.V. (1957)
Unschädlichkeitsprüfung von Maul-und Klauenseuche-Adsorbatvakzinen an Säuglingsmäusen.
Inaug. Diss. Hannover 1957.
45. Michelsen, E. (1951)
Expériences et recherches pour la mise lumière des effets antigène et pathogène possibles des vaccins antiaphteux vieillis.
Bull. Off. int. Epiz. 25, 644.
46. Möhlmann, H. (1952)
Über das Zustandekommen der aktiven Immunität der Maul- und Klauenseuche.
Zbl. Bakt. 1. Orig. 158, 168.

47. Moesbrugger, G.A. (1948)
Einige theoretische Betrachtungen über die Konzentration
von Maul-und Klauenseuche-Virus in Aluminium-hydroxyd-
Vakzine.
Tierärztl. Umsch. 3, 127.
48. Mowat, G.N. and W.G.Chapman (1962)
Growth of foot-and-mouth disease virus in a fibroblastic
cell line derived from hamster kidneys.
Nature 194, 253.
49. Mussgay, M. (1959)
Über den Mechanismus der PH-Inaktivierung des Virus der
Maul-und Klauenseuche.
Monatsch. Tierheilk. 11, 185.
50. Mussgay, M. und R. Strohmaier (1958)
Gewinnung eines infektiösen Prinzips von Ribonukleinsäure
charakter aus Homogenaten mit dem Maul-und Klauenseuche-
Virus infizierter Jungmäuse.
Zbl. Bakt. 1, Orig. 173, 163.
51. Parker, R.C. (1950)
Methods of tissue culture
New York (1950).
52. Patty, R.E. (1965)
A simplified method for preparing bovine kidney cells for
growth on glass.
Am. J. Vet. Res. 26, 787.
53. Patty, R.E.; G.E.Cottral and P.Gailiunas (1965)
Comparative assay of foot-and-mouth disease virus in
salivary, mice, and cell culture.
Bull. Off. int. Epiz. 63, 1595.
54. Pehl, K.H. (1951)
Über charakteristische Veränderungen der Maul-und Klauenseuche
an den Prädispositionsstellen nach Vakzinierung.
Arch. Exper. Vet. Med. 3, 84.
55. Plowright, W. and R.D.Ferris (1961)
The preparation of bovine thyroid monolayers for use
in virological investigations.
Res. Vet. Sci. 2, 149.
56. Polatnick, J. and H.L.Bachrach (1964)
Production and purification of milligram amounts of foot
and-mouth disease virus from baby hamster kidney cell
cultures.
App. Microbiol. 12, 368
57. Polatnick, J.; R.B.Arlinghaus; J.H.Graves and K.M.Cowan (1964)
Inhibition of cell-free foot-and-mouth disease virus-
nucleic acid synthesis by antibody.
Virology 31, 601.

58. Pyl, G. (1953)
Die Herstellung eines Konzentrat-Adsorbat-Impfstoffes
gegen Maul- und Klauenseuche aus gereinigtem Antigen.
Arch. Exptl. Vet. Med. 7, 238.
59. Pyl, G. und H. Möhlmann (1954)
Über Maul- und Klauenseuche-Konzentrat-Vakzinen. II. Mitt.
Arch. Exptl. Vet. Med. 8, 442.
60. Ramen, G. und P. Descombes (1925)
Sur l'immunisation antitétanique et sur la production
de l'antitoxine tétanique.
C. R. Soc. Biol. 92, 508.
61. Röhrer, H. (1967)
Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren (Band II)
VEB Gustav Fischer Verlag Jena.
62. Schmit-jensen, H.O.; S. Schmidt and A. Hansen (1936)
Über aktive Immunisierung von Meerschweinchen gegen
Maul- und Klauenseuche mit Hochvirulentem, an Aluminium-
hydroxyd adsorbiertem Virus.
Maanedskr. J. Dyrjæg. 48, 1.
63. Schneider, B. (1955)
Zur Infektiosität der Maul- und Klauenseuche-Adsorbat-
vakzine.
M hefte Tierhk. 7, 81.
64. Sellers, R.F. (1955)
Growth and titration of the viruses of foot-and-mouth
disease and vesicular stomatitis in kidney monolayer
tissue cultures.
Nature 176, 547.
65. Sellers, R.F. (1960)
The growth and antigenicity of the virus of foot-and-
mouth disease in pig kidney tissue cultures.
Arch. ges. Virusforsch. 9, 621.
66. Sellers, R.F.; L.M. Burt; A. Cumming and D.L. Gailiunas (1959)
The behavior of strains of the virus of foot-and-mouth
disease in pig, calf, ox and lamb kidney tissue cultures.
Arch. ges. Virusforsch. 9, 637.
67. Skinner, H.H. (1951)
Propagation of foot-and-mouth disease virus in unweaned
white mice.
Proc. Roy. Soc. Med. 44, 1041.
68. Snowden, W.A. (1966)
Growth of foot-and-mouth disease virus in monolayer
cultures of calf thyroid cells.
Nature 210, 1079.
69. Strohmaier, K.; W. Schwöbel und J. Hindennach (1967)
Zur Proteinstruktur des Virus der Maul- und Klauenseuche.
Z. Naturforsch. 22b, 1362.

70. Taylor, A.R.; W.W.Kay; E.A.Timm; A.E.Hook and I.W.Mc Lean, Jr.
(1957)- Inactivation of poliomyelitis virus for the preparation of vaccines.
J. Immunol. 79, 265.
71. Timm, E.A.; I.W.Mc Lean, Jr; C.H.Kupsky and A.E.Hook (1956)
The nature of the formalin inactivation of poliomyelitis virus.
J. Immunol. 77, 444.
72. Trautman, R.; M.Sauan and S.S. Breese (1959)
Partition by zone ultracentrifugation of the two complementfixing particles in the foot-and-mouth disease virus.
J. Amer. Chem. Soc. 81, 4040.
73. Ubertini, B.; L.Nardelli; A.Dal Prato; G.Panina and G.Santero (1960)
Process Report: Large scale production of foot-and-mouth disease virus.
J. Biochem. Microbiol. Techn. Eng. 2, 327.
74. Vallée, H.; H.Carré und P.Rinjard (1926)
Sur l'immunisation antiaphteuse par le virus formolé
Rev. Gén. Méd. Vét. 35, 129.
75. Vallée, H.; H.Carré und P.Rinjard (1926b)
Sur l'immunisation antiaphteuse.
J. Méd. Vét. Zoo. Tech. 72, 367.
76. Vande Woude, G.F. and H.L.Bachrach (1968)
Evidence for a single structural polypeptide in foot-and-mouth disease virus.
Arch. ges. Virusforsch. 23, 353.
77. Waldmann, O. und K.Köbe (1938)
Die aktive Immunisierung des Rindes gegen Maul-und Klauenseuche (vorläufige Mitteilung).
Berl. Tierärztl. Wschr. 54, 317.
78. Wesslén, T. and Z.Dinter (1956)
The cultivation and titration of foot-and-mouth disease virus in cultures of different bovine tissues.
Nord. Vet. Med. 8, 795.
79. Wesslén, T. and Z.Dinter (1957)
The inactivation of foot-and-mouth disease virus by formalin.
Arch. ges. Virusforsch. 7, 394.
80. Wisniewski, J. (1965)
Badania nad wzrostem przeciwciał zobojętniających po uodpornianiu hydła różnymi dawkami trojwalentniej szczepionki p/pryszczycowej.
Med. Weter. (Lublin) 21, 471.

81. Wittmann, G. (1968)

Der Einfluß hochmolarer Salzlösungen auf die Thermo-
inaktivierung des Maul-und Klauenseuche (MKS)-Virus.
Zbl. Bakt. 1. Orig. 207, 1.

82. Youngner, J.S. (1952)

Monolayer tissue cultures. 1. Preparation and standar-
isation of suspension of trypsin-dispersed monkey
kidney cells.
Proc. Soc. Exp. Biol, 85, 202.

Lebenslauf

Am 7. Dezember 1940 wurde ich, Aly Youssif Ahmed Moussa, als Sohn des Landwirtschafts-Ingenieurs Youssif Ahmed Moussa und seiner Ehefrau Fatma, geb. Abdel-Kriem in Shebin El-Kom (Monofia / Ägypten) geboren.

Von 1944 bis 1952 besuchte ich die Volksschule. Ab 1952 besuchte ich das Gymnasium und legte 1957 die Reifeprüfung ab.

Von 1957 bis 1963 studierte ich Veterinärmedizin an der Universität Kairo. Mein Studium schloß ich mit dem Grad eines Bakkalaureus der Veterinärmedizin (B.V.Sc.) mit der Gesamtnote "gut" ab.

Ab März 1963 war ich Wiss. Assistent in der Mikrobiologischen Abteilung des Veterinary Research Institute des Landwirtschaftsministeriums in Kairo. Im September 1963 wurde ich Wiss. Assistent am Institut für Mikrobiologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Kairo. Im Juni 1965 legte ich mit Erfolg die Postgraduate Course Examinations ab.

Auf Veranlassung der Studienmission der Vereinigten Arabischen Republik habe ich im Oktober 1965 die Erlaubnis für einen Studienaufenthalt in der Bundesrepublik Deutschland erhalten und wurde vom Deutschen Akademischen Austauschdienst als Stipendiat ausgewählt.

Nach einem 6-monatigen Sprachkursus wurde ich für das Sommersemester 1966 in der Veterinärmedizinischen Fakultät der Justus-Liebig-Universität in Gießen immatrikuliert. Durch Vermittlung von Herrn Prof. Dr. R. Rott, Direktor des Instituts für Virologie der Universität Gießen, wurde mir ab September 1966 in der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankeheiten der Tiere in Tübingen ein Arbeitsplatz zur Verfügung gestellt. Hier führte ich die Versuche für meine Doktorarbeit durch.

Zum Schluß meiner Arbeit darf ich meinen hochverehrten Lehrern Herrn Professor Dr. R. Rott und Herrn Leitenden Direktor und Professor Dr. G. Eißner für die Überlassung des Themas und ihre immer freundliche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation meinen verbindlichen Dank aussprechen.

Zu großem Dank bin ich auch dem Präsidenten der Bundesforschungsanstalt, Herrn Professor Dr. M. Mussgay, verpflichtet, der mir den Arbeitsplatz und die Mittel für die Versuche zur Verfügung stellte.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst sei an dieser Stelle für die Überlassung des Stipendiums gedankt.

